



Institut für Experimentelle Gentherapie
und Tumorforschung



UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer

Analyse metastasierungsrelevanter microRNAs und deren prognostische Bedeutung für das Peniskarzinom

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von

Juliane Marie Hartz

geb. am 13.06.1987 in Hannover

Rostock, den 29. Mai 2018

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. *Gutachter:* Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer, Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung, Universitätsmedizin Rostock
2. *Gutachter:* Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg, Urologische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock
3. *Gutachter:* Prof. Dr. Julio Vera-González, Zentrum für Bioinformatik, Universitätsklinikum Erlangen

Datum der Einreichung: 29.05.2018

Datum der Verteidigung: 16.01.2019

Inhaltverzeichnis

Inhaltverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Peniskarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und histologische Einteilung	1
1.1.2 Inguinale Lymphknoten-Metastasierung als wichtigster prognostischer Faktor und Herausforderung an die moderne Diagnostik.....	3
1.1.3 Therapie des Peniskarzinoms	5
1.2 MicroRNAs und ihre Relevanz für die Tumorforschung.....	7
1.2.1 Biogenese und Funktion von microRNAs	7
1.2.2 Die Rolle von microRNAs bei Tumorgenese und Metastasierung.....	9
1.2.3 Stellenwert von microRNAs für die heutige Diagnostik und Therapie	10
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Instrumente	13
2.1.2 Chemikalien und Puffer	14
2.1.3 Kits.....	14
2.1.4 Zelllinien.....	15
2.1.5 Patientenproben.....	16
2.2 Methoden	18
2.2.1 RNA-Arbeitstechniken	18
2.2.1.1 RNA-Isolierung aus FFPE-Gewebeproben.....	18
2.2.1.2 MicroRNA-Isolierung aus Zelllysaten.....	18
2.2.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit.....	18
2.2.1.4 Reverse Transkription von microRNA	19
2.2.1.4.1 Reverse Transkription im Rahmen der TaqMan® Human MicroRNA Arrays.....	19
2.2.1.4.2 Reverse Transkription im Rahmen der TaqMan® MicroRNA Assays	21
2.2.2 DNA-Arbeitstechniken	22
2.2.2.1 Quantitative real-time PCR - TaqMan® Human MicroRNA Arrays	22

2.2.2.1.1	Präamplifikation von microRNA-cDNA	22
2.2.2.1.2	Quantitative real-time PCR.....	23
2.2.2.2	Quantitative real-time PCR - TaqMan® MicroRNA Assays.....	24
2.2.3	Zellkulturarbeiten und funktionelle Analysen	26
2.2.3.1	Zellkultur	26
2.2.3.2	Zellernte	26
2.2.3.3	Zellzahlbestimmung	26
2.2.3.4	Kulturelle Funktionsanalyse mithilfe des Matrigel® Invasion Assays	27
2.2.3.4.1	Funktionsweise des Matrigel® Invasion Assays	27
2.2.3.4.2	Durchführung des Matrigel® Invasion Assays	28
2.2.4	Meta-Analyse zur Identifizierung differentiell exprimierter microRNA-Targets und microRNA-Regulatoren des Peniskarzinoms	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Identifikation von miR-1, miR-101 und miR-204 als potentiell metastasierungsrelevante microRNAs des Peniskarzinoms.....	31
3.1.1	Vergleich der microRNA-Expressionsmuster metastasierender und nicht metastasierender Primärtumore – TaqMan® Low Density Arrays.....	31
3.1.2	Validierung der Expressionslevel von miR-1, miR-101 und miR-204 mittels TaqMan® MicroRNA Assays	34
3.2	Korrelation differentiell regulierter microRNAs in Assoziation mit Überlebensraten von Patienten	37
3.2.1	Die wechselseitige Korrelation der Expressionslevel von miR-1, miR-101 und miR-204 lässt Veränderungen eines regulatorischen Netzwerkes auf transkriptioneller Ebene vermuten	37
3.2.2	Der Verlust von miR-1, miR-101 und miR-204 ist assoziiert mit der Deregulation gemeinsamer Zielgene und einer schlechteren Prognose für Patienten ...	40
3.3	Charakterisierung neu etablierter Peniskarzinomzelllinien hinsichtlich microRNA-Expression und Invasivität	44
3.3.1	Verstärkte Invasivität von humanen PeCa-Zelllinien, die aus Lymphknotenmetastasen des Peniskarzinoms etabliert wurden.....	44
3.3.2	Analyse der Expression von miR-1, miR-101 und miR-204 in PeCa-Zelllinien... ..	46
4	Diskussion.....	49
4.1	Bedeutung von microRNAs bei der Erforschung des Peniskarzinoms.....	49
4.2	Vergleichende Betrachtung der untersuchten microRNAs in Plattenepithelkarzinomen verschiedener Entitäten.....	51

4.3	Relevanz des microRNA-Tripletts miR-1, miR-101 und miR-204 für die Metastasierung des Peniskarzinoms.....	53
4.4	Epigenetische Mechanismen als Ursache für die korrelierende Expression von miR-1, miR-101 und miR-204	55
4.5	Bedeutung von Zelllinien bei der Erforschung des Peniskarzinoms unter Berücksichtigung des microRNA-Tripletts miR-1, miR-101 und miR-204.....	58
5	Zusammenfassung.....	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Thesen	74
8	Danksagung.....	76
9	Lebenslauf	77
10	Selbstständigkeitserklärung	79

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANXA1	<i>annexin A1</i>
ANXAIV	<i>annexin A4</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CaCl₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i> /komplementäre DNS
cm²	Quadratzentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL14	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>
D2-40	monoklonaler Antikörper, Marker für lymphatisches Endothel
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal/critical region 8</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> /Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i> /doppelsträngige RNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E2F	Familie von Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten
E6/E7	virale Onkogene des humanen Papillomavirus
EAU	<i>European Association of Urology</i> /Europäische Gesellschaft für Urologie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E, pElF4E – phosphorylated/activated eIF4E</i>
et al.	et alii/et aliae/et alia
Exportin-5	Transportprotein aus der <i>Karyopherin</i> -Familie
EZH2	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
FCS/FKS	<i>fetal calf serum</i> /Fetales Kälberserum

FFPE	<i>formalin-fixed, paraffin-embedded</i> /Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet (Gewebe)
FN1	<i>fibronectin 1</i>
h	Stunde
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i> /Plattenepithelkarzinom der Kopf- und Hals-Region
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	<i>Hazard Ratio</i>
KAI1/CD82	<i>cluster of differentiation 82</i>
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
Ki-67	Proliferationsmarker
LVD	<i>lymphatic vessel density</i>
M	Mol/Molarität
MEM	<i>Modified Eagle's Medium</i>
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miR/miRNA	<i>microRNA</i> /microRNA
ml	Milliliter
MM	<i>Master Mix</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin, pmTOR – phosphorylated/activated mTOR</i>
N/n	Anzahl, Anteil
NA	<i>not available</i> /nicht vorliegend
NCX1	<i>sodium-calcium exchanger 1</i>
NEAs	<i>non-essential amino acids</i> /Nicht-essentielle Aminosäuren
nt	Nukleotid/-e
p16/p16^{ink4a}	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
p53	<i>tumor suppressor protein 53</i>
p68	<i>probable ATP-dependent RNA helicase DDX5/DEAD box protein 5/RNA helicase p68</i>

p72	<i>probable ATP-dependent RNA helicase DDX17</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline/Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction/Polymerase-Kettenreaktion</i>
PRC2	<i>polycomb repressive complex 2</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction/quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion</i>
RAN-GTP	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>
rap1GAP	<i>rap1 GTPase-activating protein 1</i>
Rb/pRb	<i>retinoblastoma protein/Retinoblastom-Protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid/Ribonukleinsäure</i>
RNU6B	<i>housekeeping gene, Syn. RNA U6 small nuclear 2</i>
rpm	<i>rounds per minute/Umdrehungen pro Minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction/Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion</i>
s	Sekunde
SLC8A1	<i>solute carrier family 8 member A1</i>
SLIT2	<i>slit homolog 2 protein</i>
SM	Supplement Mix
Smad-Proteine	<i>small body size proteins</i> mit Beteiligung an TGF- β -vermittelten Signalwegen
SUZ12	<i>subunit of polycomb repressive complex 2</i>
TAGLN2	<i>transgelin 2</i>
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie der T-Zellreihe
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNM-Schema	Klassifikationssystem für das Staging maligner Tumoren; T=Größe/Infiltrationstiefe des Primärtumors, N=Befall regionaler Lymphknoten, M=Fernmetastasen
U	Enzymeinheit
UICC	<i>Union internationale contre le cancer/Internationale Vereinigung gegen Krebs</i>
unb.	Unbekannt

UNG	Uracil-N-Glycosylase
UTR	<i>untranslated region</i> /untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
vs.	versus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
YWHAZ	<i>14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ)</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lymphogene Metastasierung des Peniskarzinoms	4
Abb. 2: Biogenese von microRNAs	8
Abb. 3: Aufbau und Funktionsweise des Matrigel® Invasion Assays	28
Abb. 4: Identifikation von insgesamt 62 microRNAs als mögliche <i>metastamiRs</i> des Peniskarzinoms	33
Abb. 5: Ergebnis des Mann-Whitney U-Tests: <i>miR-1</i> , <i>miR-101</i> und <i>miR-204</i> als mögliche tumorsuppressiv wirkende <i>metastamiRs</i> des Peniskarzinoms	34
Abb. 6: Expression von <i>miR-1</i> , <i>miR-101</i> und <i>miR-204</i> in metastasierten Primärtumoren und assoziierten Lymphknotenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten Primärtumoren und Normalgewebe	36
Abb. 7: Die wechselseitige Korrelation der Expressionslevel von <i>miR-1</i> , <i>miR-101</i> und <i>miR-204</i>	39
Abb. 8: Mögliche transkriptionelle Aktivatoren und Repressoren von <i>miR-1</i> , <i>miR-101</i> und <i>miR-204</i>	40
Abb. 9: Die geringere Expression von <i>miR-1</i> , <i>miR-101</i> und <i>miR-204</i> ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose	41
Abb. 10: Putatives gemeinsames Netzwerk aus prognostizierten Zielgenen von <i>miR-1</i> , <i>miR-101</i> und <i>miR-204</i>	43
Abb. 11: Invasionsassay der vier etablierten Peniskarzinom-Zelllinien	45
Abb. 12: Geringere Expression von <i>miR-1</i> , <i>miR-101</i> und <i>miR-204</i> in Zelllinien metastasierter Primärtumore und assoziierter Lymphknotenmetastasen	47
Abb. 13: Potentieller Feedbackmechanismus, welcher den Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms unterhält	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Histologische Subtypen des Plattenepithelkarzinoms des Penis, ihr prozentualer Anteil am Gesamtvorkommen und ihre Besonderheiten	2
Tab. 2: Aktuelle TNM-Klassifikation des Peniskarzinoms nach UICC	6
Tab. 3: Klinische und histopathologische Merkmale von FFPE-Proben der in dieser Studie einbezogenen Peniskarzinom-Patienten	17

1 Einleitung

1.1 Das Peniskarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und histologische Einteilung

Das Peniskarzinom, bei dem es sich um ein Plattenepithelkarzinom handelt, ist in westlichen Industrienationen mit 0,9 bis 1,0 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr eine im Vergleich zu anderen Tumorentitäten eher seltene Erkrankung. In einigen Schwellenländern Afrikas, Lateinamerikas oder auch Südasiens kommt sie weitaus häufiger vor, sodass das Peniskarzinom dort bisweilen die zweithäufigste Malignomkrankung des Mannes darstellt (Parkin et al., 2002). Dies ist unter anderem auf die dort herrschenden ungünstigeren sozioökonomischen Verhältnisse und damit einhergehende unzureichende hygienische Bedingungen zurückzuführen. Eine weitere Rolle spielen auch kulturelle und religiöse Bräuche, die mit hygienischen Einschränkungen einhergehen. So herrscht beispielsweise eine eindeutig geringere Inzidenz des Peniskarzinoms in jüdischen oder muslimischen Gemeinschaften, in denen eine Zirkumzision nach der Geburt oder vor Erreichen der Pubertät vorgenommen wird (Pizzocaro et al., 2010).

Zu den stärksten Risikofaktoren, die die Entstehung eines Peniskarzinoms begünstigen, zählen in diesem Zusammenhang die Phimose, chronische Entzündungen des Penis (z.B. die *Balanoposthitis* oder der *Lichen sclerosus et atrophicus*), Promiskuität sowie ein chronischer Nikotinabusus (Daling et al., 2005; Horenblas et al., 2000; Pizzocaro et al., 2010). Darüber hinaus scheint eine Infektion mit den high-risk Typen humaner Papillomaviren (HPV), vor allem Typ 16 und Typ 18, mit der Entstehung bestimmter histologischer Subtypen des Peniskarzinoms assoziiert zu sein (Barzon et al., 2014; Pizzocaro et al., 2010). Zu diesen zählen v. a. der basaloide und der warzige Subtyp, sowie das gemischte Karzinom. Das klassische Plattenepithelkarzinom dagegen weist keine direkte pathogenetische Assoziation zu oben genannten humanen Papillomaviren auf. Insgesamt ist die Datenlage jedoch uneinheitlich und neben obigen Genesen treten ebenso de-novo Erkrankungen auf (Miralles-Guri et al., 2009).

Das Plattenepithelkarzinom des Penis lässt sich histologisch in verschiedene Subtypen unterteilen, wobei der Subtyp des klassischen Plattenepithelkarzinoms mit bis zu 65 % am weitaus häufigsten vorkommt (Hakenberg et al., 2015). Tabelle 1 zeigt eine grobe Übersicht dieser Subtypen, ihren Anteil am Gesamtvorkommen sowie bestimmte

Charakteristika. Histologische Gruppen mit geringer Inzidenz, wie zum Beispiel der sarkomatoide Subtyp, sind häufig vereint mit hoher Tumoraggressivität und dementsprechend schlechter Prognose.

Tabelle 1. Histologische Subtypen des Plattenepithelkarzinoms des Penis, ihr prozentualer Anteil am Gesamtvorkommen und ihre Besonderheiten (Hakenberg et al., 2015; Pizzocaro et al., 2010).

Histologischer Subtyp	Anteil in %	Charakteristika
Klassisches Plattenepithelkarzinom	48–65	Prognose abh. vom TNM-Stadium
Basaloides Karzinom	4–10	schlechte Prognose, frühe inguinale Lymphknotenmetastasierung, HPV-Assoziation*
Verruköses Karzinom	3–8	gute Prognose, keine Metastasierung
Warziges Karzinom	7–10	gute Prognose, selten metastasierend, HPV-Assoziation*
Papilläres Karzinom	5–15	gute Prognose, selten metastasierend
Gemischtes Karzinom	9–10	heterogene Gruppe bzgl. Prognose und Metastasierungsmuster, tlw. HPV-assoziiert*
Sarkomatoides Karzinom	1–3	sehr schlechte Prognose, frühe vaskuläre Metastasierung
Adenosquamöses Karzinom	<1	geringe Mortalität trotz hohem Metastisierungspotential

*HPV – humanes Papillomavirus (häufig Typ 16, seltener auch Typ 18 u. a.)

Nicht nur in Bezug auf andere Malignome des männlichen Geschlechts, sondern auch im Vergleich zu anderen Plattenepithelkarzinomen, ist das Peniskarzinom eine seltene Tumorerkrankung. Weitaus häufiger auftretend und daher auf molekularbiologischer sowie -pathologischer Ebene genauer erforscht – und ebenfalls mit einer HPV-Infektion assoziiert – sind beispielsweise Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (ca. 50 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr) oder der Cervix uteri (ca. 9 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr) (Parkin et al., 2002; Siegel et al., 2012). Während das Peniskarzinom in 40 bis 50 Prozent mit einer entsprechenden Infektion in Verbindung gebracht wird, lässt sich in bis zu 70 Prozent aller Zervixkarzinome und in 20 bis 60 Prozent aller Kopf-Hals-Tumore die DNA der oben genannten humanen Papillomaviren nachweisen (Daling et al., 2005; Holzinger et al., 2012; Pizzocaro et al., 2010). Vom Robert Koch-Institut wurde bisher lediglich eine

Vakzinierung von Mädchen und Frauen zur Prävention der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs empfohlen und sollte vor dem ersten Geschlechtsverkehr vorgenommen werden. Eine generelle Impfung auch des männlichen Geschlechts zur Vorbeugung anderer HPV-assoziiierter Tumorentitäten wird derzeit noch kontrovers diskutiert (Protzel und Hakenberg, 2013; Prue et al., 2016).

Mit seiner raschen und beinahe ausschließlich lymphogenen Metastasierung kommt das Peniskarzinom bezüglich seines Metastasierungsverhaltens den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches am nächsten. Auch auf molekularbiologischer Ebene lassen sich Gemeinsamkeiten finden, womit diese Tumorentität bei der Suche nach weiteren Erkenntnissen über molekulare Mechanismen von Tumorgenese und Metastasierung als Wegweiser gelten mag.

1.1.2 Inguinale Lymphknoten-Metastasierung als wichtigster prognostischer Faktor und Herausforderung an die moderne Diagnostik

Mit Ausnahme weniger Subtypen ist das Plattenepithelkarzinom des Penis ein fast ausschließlich lymphogen metastasierender Tumor, wobei zunächst die regionalen inguinalen Lymphknoten befallen werden. Der Befall inguinaler Lymphknoten erscheint bisher als der wichtigste prognostische Faktor (Abb. 1). Derzeit existiert jedoch noch kein nicht- oder minimal-invasives diagnostisches Verfahren, welches den Lymphknoten-Status betroffener Patienten genau zu bestimmen vermag (Graafland et al., 2010; Pizzocaro et al., 2010).

Die manuelle Palpation inguinaler Lymphknoten im Rahmen der klinisch körperlichen Untersuchung kann einen ersten und damit richtungsweisenden Anhaltspunkt für den nodalen Tumorbefall geben. Zum einen weisen jedoch auch nicht palpable und damit klinisch unauffällige Lymphknoten in bis zu 25 % Mikrometastasen auf, zum anderen sind auch suspekte Lymphknoten zu 50 % rein reaktiv bedingt (Al Ghazal et al., 2013; Bhagat et al., 2010). Darüber hinaus stoßen auch bildgebende, nuklearmedizinische und die minimal-invasiven Verfahren bezüglich ihrer diagnostischen Sensitivität und Spezifität rasch an ihre Grenzen, womit die Detektion einer inguinalen Metastasierung erschwert bleibt (Hakenberg et al., 2015).

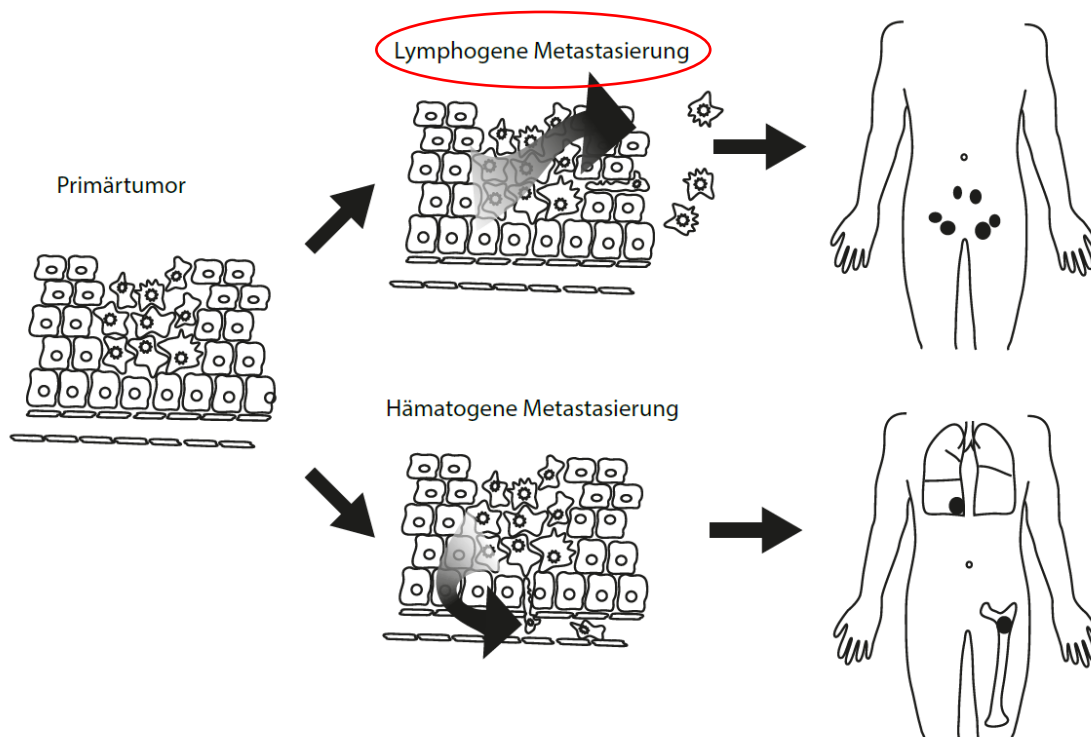


Abb. 1: Lymphogene Metastasierung des Peniskarzinoms. Das Plattenepithelkarzinom des Penis ist, anders als andere Tumorentitäten und mit Ausnahme weniger histologischer Subtypen, ein fast ausschließlich lymphogen metastasierender Tumor. Der Befall inguinaler Lymphknotenmetastasen stellt den bisher wichtigsten prognostischen Faktor für betroffene Patienten dar.

Eine therapeutische oder auch prophylaktische Lymphadenektomie mag damit zwar für einen Teil der Patienten von großem therapeutischen Nutzen sein. Demgegenüber stehen jedoch die schwerwiegenden akuten und chronischen Folgen einer operativen Entfernung regionaler Lymphknoten, weshalb diesbezüglich bisher keine Einigkeit über eine standardisierte Vorgehensweise besteht. Zu den häufigen akuten Komplikationen einer Lymphadenektomie zählen unter anderem schwere und rezidivierende Wundinfektionen. Bei den chronischen Folgen steht vor allem das Lymphödem der Beine und der Genitalregion im Vordergrund, welches mit einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität des Patienten einhergehen kann (Bevan-Thomas et al., 2002; Graafland et al., 2010; Stuijver et al., 2013).

Bei nicht palpablen Lymphknoten richtet sich die Entscheidung darüber, ob eine inguinale Lymphknoten-Entfernung vorgenommen werden soll, vornehmlich nach dem TNM-Stadium des jeweiligen Patienten. Ein invasives Lymphknoten-Staging wird demnach bei jedem Patienten mit einem Tumorstadium von mindestens pT1 G1 durchgeführt. Damit werden insgesamt bis zu 80 % der Patienten übertherapiert, die dann trotz des fehlenden Lymphknotenbefalls an den genannten Folgen einer inguinalen Lymphadenektomie leiden (Hakenberg et al., 2015; Sonpavde et al., 2013). Dieser

Umstand unterstreicht die Forderung nach weiteren diagnostischen Mitteln, um betroffenen Patienten die Komplikationen einer nicht erforderlichen Lymphadenektomie zu ersparen. Andererseits müssen jedoch alle Patienten mit einem positiven Lymphknotenstatus gleichermaßen identifiziert werden können, um sie bestmöglich therapieren zu können.

1.1.3 Therapie des Peniskarzinoms

Aufgrund der Seltenheit des Peniskarzinoms in Mitteleuropa sind bisher kaum Therapiestudien als Evidenzgrundlage sowie molekularbiologische Kenntnisse als Ausgangspunkt für mögliche Therapieansätze vorhanden. Trotz diesbezüglicher Fortschritte in den vergangenen Jahren orientieren sich die aktuellen Leitlinien an wenigen Studien mit nur geringer Patientenzahl. In frühen Stadien besteht für betroffene Patienten ein kurativer Therapieansatz, und eine organerhaltende operative Behandlung ist noch möglich. Die frühe Diagnosestellung ist daher von großer Bedeutung. Ist das Karzinom bei Erstdiagnose jedoch weiter fortgeschritten, ist eine Organerhaltung meist nicht mehr möglich. Dies bedeutet nicht nur eine physische Beeinträchtigung, sondern auch einen deutlichen psychischen Leidensdruck für die betroffenen Männer. Eine Heilung im fernmetastasierten Stadium ist nicht mehr möglich (Protzel et al., 2009; Protzel und Hakenberg, 2013).

Bei noch lokal begrenztem Tumorleiden hat die organerhaltende operative Therapie in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Selbst unter Beachtung empfohlener Sicherheitsabstände und der Durchführung intraoperativer Schnellschnitte bleibt jedoch ein Risiko für die Entwicklung eines Lokalrezidivs bestehen. Die Evidenzlage bezüglich des einzuhaltenden minimalen Sicherheitsabstandes ist nach wie vor unzureichend. Dennoch liegt der heutzutage durchschnittlich eingehaltene Abstand weit unter den früher angestrebten 2 cm (Pizzocaro et al., 2010; Protzel und Hakenberg, 2013). Bis zu einem T1a-Stadium kann damit eine lokale Exzision erfolgen, welche für den Patienten sicherlich die geringsten Einschränkungen zur Folge hat. In den sehr frühen Tumorstadien Tcis und Ta kann auch eine lasertherapeutische Behandlung ausreichend sein. Die Anwendung topischer Chemotherapeutika hat bisher keine befriedigenden Kontrollraten erzielen können (Alnajjar et al., 2012; Hegarty et al., 2009). Bei T1b- sowie T2-Tumoren mit fehlender Infiltration des Corpus cavernosum kann eine Glansektomie mit anschließender Spalthautdeckung ausreichend sein. Bei Bestehen eines T2-Tumors mit Infiltration des Corpus cavernosum ist jedoch eine Teilamputation des Penis unumgänglich. In den noch weiter fortgeschrittenen Stadien T3 und T4 ist

meist eine komplette Penisamputation mit Anlage einer perinealen Urethrostomie notwendig (Hakenberg und Protzel, 2014; Protzel und Hakenberg, 2013; Sonpavde et al., 2013).

Tabelle 2. Aktuelle TNM-Klassifikation des Peniskarzinoms nach UICC (Sobin, 2009).

T – Primärtumor	Tcis	Carcinoma in situ
	Ta	Nichtinvasives verruköses Karzinom
	T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
	T1a	Keine lymphovaskuläre Infiltration, kein G3 oder G4
	T1b	Lymphovaskuläre Infiltration oder G3/G4
	T2	Tumor infiltriert Corpus spongiosum oder cavernosum
	T3	Tumor infiltriert Urethra
	T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen
N – regionäre Lymphknoten	N0	Keine inguinalen tumorösen Lymphknoten
	N1	1 befallener unilateraler Lymphknoten
	N2	Multiple und/oder bilaterale mobile inguinale Lymphknoten
	N3	Fixierte inguinale oder pelvine Lymphknoten
pN – Lymphknoten (pathologische Klassifikation)	pN0	Keine tumorösen Lymphknoten
	pN1	1 befallener unilateraler Lymphknoten (rein intranodale Ausbreitung)
	pN2	Multiple und/oder bilaterale inguinale Lymphknotenmetastasen
	pN3	Pelvine Lymphknotenmetastasen oder extranodale Tumorausbreitung in inguinalen Lymphknoten
M – Fernmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Das Management regionärer Lymphknoten richtet sich zunächst nach deren Erscheinungsbild in der klinisch körperlichen Untersuchung. Bei nicht palpablen Lymphknoten und niedrigem Tumorstadium (Tcis und Ta) erscheint die reine Nachsorge und damit klinische Überwachung des Patienten ausreichend. Ab einem T1-Stadium wird hingegen eine zunächst modifizierte und bei positiver Histologie dann radikale inguinale Lymphadenektomie angestrebt. Sind Lymphknoten hingegen palpabel, so wird zunächst eine histologische Sicherung mittels Feinnadel- oder Exzisionsbiopsie vorgenommen. Das histopathologische Ergebnis entscheidet über die Durchführung einer radikalen inguinalen Lymphadenektomie. Sofern sich bei mehr als einem der entnommenen Lymphknoten ein positives Ergebnis zeigt, schließt sich zusätzlich eine ipsilaterale pelvine Lymphadenektomie mit adjuvanter Chemotherapie an. Patienten mit fixierten oder auch exulzerierten inguinalen Lymphknoten haben im Allgemeinen eine sehr schlechte Prognose. Durch Applikation einer neoadjuvanten Systemtherapie und nachfolgender kompletter Lymphknotenresektion kann jedoch die Chance auf ein verbessertes Langzeitüberleben erhöht werden (Pizzocaro et al., 2010; Pizzocaro et al., 1997; Protzel et al., 2009).

Eine systemtherapeutische Behandlung kommt beim Peniskarzinom sowohl in kurativer Intention bei manifestem regionalem Lymphknotenbefall als auch unter palliativem Therapieansatz im fernmetastasierten Stadium zum Einsatz. Allerdings bestehen auch hier keine eindeutigen Standards bezüglich der therapeutischen Vorgehensweise, sondern lediglich auf wenigen Studien mit nur geringer Patientenzahl basierende Empfehlungen (Protzel und Hakenberg, 2009; Seitz et al., 2014). Das früher oft angewandte „klassische“ Dexeus-Schema (Vinblastin, Methotrexat und Bleomycin) wurde aufgrund seiner Toxizität und zugleich fehlenden Wirksamkeit im Verlauf der vergangenen Jahre zunehmend verlassen (Hakenberg et al., 2006; Protzel und Hakenberg, 2013). Heute kommen vor allem taxanhaltige Schemata in Kombination mit Cisplatin und 5-Fluoruracil zum Einsatz. Bei manifestem inguinalen Lymphknotenbefall kommt der Chemotherapie die größte Bedeutung zu und ist Bestandteil adjuvanter sowie neoadjuvanter und damit kurativer Therapieansätze. Im fernmetastasierten Stadium muss zwischen einer palliativen Systemtherapie und einer „*best supportive care*“ entschieden werden (Protzel et al., 2013; Seitz et al., 2014).

1.2 MicroRNAs und ihre Relevanz für die Tumorforschung

1.2.1 Biogenese und Funktion von microRNAs

MicroRNAs gehören zu einer großen Gruppe nicht-kodierender RNAs, welche sich aus 21 bis 25 Nukleotiden zusammensetzen. Diese Moleküle sind durch posttranskriptionelles *gene silencing* von mRNAs an der Regulation der Genexpression und damit an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Dazu zählen neben der Zelldifferenzierung und -proliferation auch die Tumorgenese und -progression, womit microRNAs in den vergangenen Jahren zunehmend in den Blickpunkt der Tumorforschung geraten sind (Bartel, 2009; Lu et al., 2005).

Die Biogenese von microRNAs beginnt im Kern der Zelle und verläuft über verschiedene Vorläufermoleküle bis hin zur funktionsfähigen reifen microRNA (*mature miRNA*), welche durch spezifische Basenpaarungen mRNAs erkennt und deren Translation hemmt (Abb. 2) (Davis und Hata, 2009).

Nach der Transkription eines microRNA-Gens im Nukleus durch die RNA-Polymerase-II oder -III wird die so entstehende *primary miRNA* (*pri-miRNA*) durch einen sog. Mikroprozessierungskomplex, unter anderem bestehend aus der Ribonuklease Drosha und dem dsRNA-Bindeprotein DGCR8 sowie verschiedenen RNA-Helikasen, zu einer 60 bis 100 nt messenden *precursor miRNA* (*pre-miRNA*) mit spezifischer Haarnadelstruktur prozessiert (Gregory et al., 2004; Lee et al., 2004). Diese wird durch

die Interaktion mit Exportin-5 und RAN-GTP vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert, wo ein zweiter Spaltungsprozess, katalysiert durch die Ribonuklease Dicer, vollzogen wird (Bohnsack et al., 2004; Lee et al., 2002). Die dadurch entstehende doppelsträngige und etwa 21 nt lange reife microRNA setzt sich aus einem *guide strand* und einem *passenger strand* zusammen. Während der *passenger strand* nach Bindung des Doppelstrangs an den *RNA Induced Silencing Complex* (RISC) abgebaut wird, bleibt der *guide strand* mit dem genannten Multiprotein-Komplex verbunden (Davis und Hata, 2009; Gregory et al., 2005). In dieser Form der reifen microRNA geht der *guide strand* eine Verbindung mit der jeweils komplementären 3'UTR-Zielsequenz von bestimmten mRNAs ein. Abhängig vom Ausmaß der Komplementarität beider Stränge sowie der Beteiligung weiterer regulatorischer Proteine kommt es nun entweder zum direkten Abbau der betroffenen mRNA oder zur Hemmung ihrer Translation. Daraus resultiert eine fehlende oder supprimierte Expression jener Gene, von welchen die entsprechenden mRNAs ihren Ursprung genommen haben (Bartel, 2009; Davis und Hata, 2009).

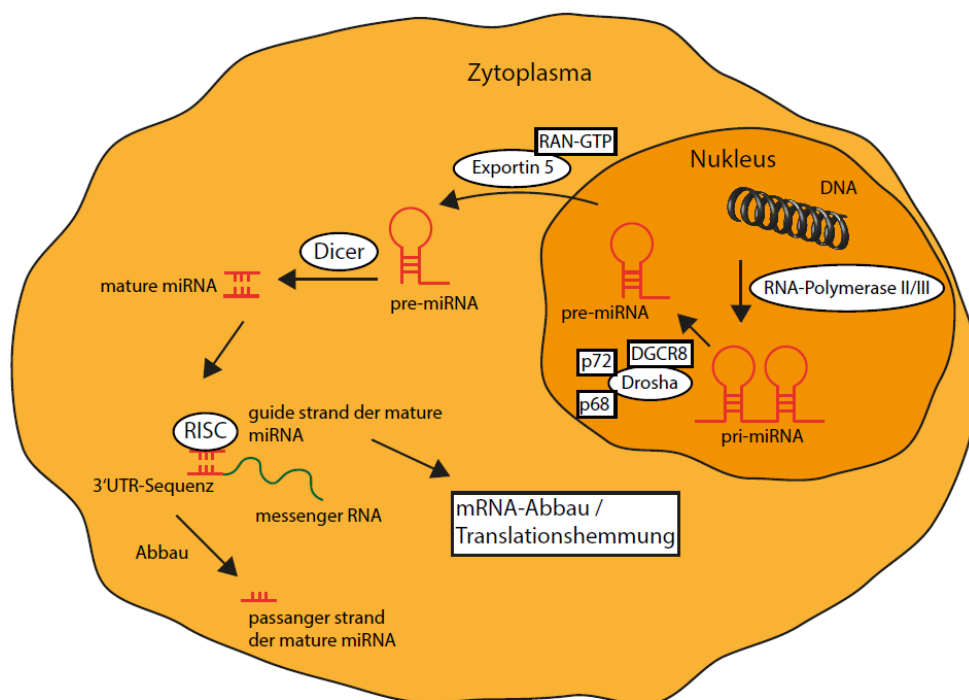


Abb. 2: Biogenese von microRNAs. Nach Transkription eines microRNA-Gens im Zellkern durch die Polymerase II/III entsteht zunächst die *pri-miRNA*. Diese wird durch die Ribonuklease Drosha in Verbindung mit weiteren Proteinen, u. a. DGCR8, p72 und p68, zur *pre-miRNA* prozessiert. Nach Überführung in das Zytoplasma der Zelle durch das RAN-GTP-abhängige Transportprotein Exportin-5 wird die *pre-miRNA* durch die Ribonuklease Dicer in die doppelsträngige *mature miRNA* gespalten. Der sog. *passenger strand* wird anschließend abgebaut, während der *guide strand*, gebunden an den RISC, eine Verbindung mit der 3'UTR-Zielsequenz spezifischer mRNAs eingeht. Dies wiederum führt entweder zur Degradation oder zur Translationshemmung der betroffenen mRNA. (Abbildung modifiziert nach Babashah et al., 2011)

Da keine ausschließliche Komplementarität zwischen reifer microRNA und gebundener mRNA herrschen muss, besitzt jede einzelne microRNA mehrere hundert bis tausend potentielle Ziel-mRNAs. Dies macht deutlich, in welchem Umfang microRNAs in der Lage sind, die Protein-Expression und damit zahlreiche Vorgänge und Signalwege einer menschlichen Zelle zu regulieren und zu kontrollieren (Berindan-Neagoe et al., 2014; Hutvagner und Zamore, 2002).

1.2.2 Die Rolle von microRNAs bei Tumorgenese und Metastasierung

Nachdem microRNAs erstmalig im Jahr 1993 im Rahmen von Untersuchungen am Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben wurden, ist ihre Bedeutung für die Tumorforschung in den darauffolgenden Jahren immer deutlicher geworden (Lee et al., 1993). In vielen Bereichen ist das komplexe Netzwerk der microRNAs bisweilen noch unerforscht, doch ihre Rolle bei der Initiation und dem Progress von Tumorerkrankungen ist mittlerweile unumstritten (Adams et al., 2014; Berindan-Neagoe et al., 2014; Knoll et al., 2013).

Maligne Tumoren sind gekennzeichnet durch ihre abnorme Fähigkeit, sich unablässig zu teilen, unabhängig von wachstumsfördernden oder wachstumshemmenden Signalen. Sie sind in der Lage, den physiologischen Prozess der Apoptose zu umgehen und ein Überangebot angiogener Faktoren zu produzieren, was ihnen die ausreichende Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet. Darüber hinaus verfügen maligne Tumorzellen über invasive Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, sich vom Primärtumor zu lösen, in das Lymph- und Blutgefäßsystem einzudringen und somit Fernmetastasen zu bilden (DeBerardinis und Chandel, 2016; Hanahan und Weinberg, 2011). Für zahlreiche microRNAs wurde in den vergangenen Jahren anhand verschiedener Malignome ein Nachweis dafür erbracht, dass sie an der Entstehung dieser Eigenschaften beteiligt sind. Über die Degradation sowie Translationshemmung von mRNAs greifen microRNAs in eine Vielzahl von Signalwegen (*pathways*) ein, welche die Tumorentstehung und deren Progress, insbesondere den Metastasierungsprozess, erst ermöglichen (Berindan-Neagoe et al., 2014).

Jede der bisher untersuchten Tumorentitäten weist dabei eine differentielle Expression von microRNAs im Vergleich zu gesundem Gewebe auf, sodass eine Definition ihrer Funktionsweise nur entitätsbezogen möglich ist (Lu et al., 2005). Dabei kann eine bestimmte microRNA abhängig von präferierten *downstream-targets* bei der Entstehung einer Tumorerkrankung als Onkogen (sog. *oncomiR*), bei der einer anderen als Tumorsuppressor fungieren (sog. *tumorsuppressormiR*) (Babashah und Soleimani,

2011; Calin und Croce, 2006). So zeigt sich beispielsweise miR-221 überexprimiert in hepatozellulären sowie kolorektalen Karzinomen und übernimmt damit eine onkogene Funktion, während sie in gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) als *tumorsuppressormiR* beschrieben wurde (Callegari et al., 2012; Gits et al., 2013; Qin und Luo, 2014). Daneben existiert der Begriff der *metastamiR*, welchem insbesondere in Zusammenhang mit dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zukommt. Die *metastamiR* ist eine microRNA, welche maßgeblich am Metastasierungsprozess beteiligt ist und damit sowohl pro- als auch antimetastatische Eigenschaften aufweisen kann (Ma, 2016).

1.2.3 Stellenwert von microRNAs für die heutige Diagnostik und Therapie

Jede Tumorentität besitzt eine individuell deregulierte microRNA-Signatur. Im Rahmen einer großen multizentrischen Studie konnte gezeigt werden, dass diese microRNA-Profile nicht nur im Tumorgewebe selbst, sondern auch im Blut betroffener Patienten nachgewiesen werden können (Lu et al., 2014). Dies scheint einerseits auf die kleine Nukleotidanzahl und den damit hoch konservierten Zustand von microRNAs zurückzuführen zu sein, andererseits auf deren Exkretion in tumorumgebendes Gewebe und somit auch in das Blutgefäßsystem (Berindan-Neagoe et al., 2014). Zudem lassen sich microRNAs in schnellen und einfachen Tests mithilfe von microRNA-Arrays in großer Anzahl nachweisen. Dies belegt, welches Potential die microRNA-Bestimmung im Rahmen der Diagnostik und damit der Früherkennung von Tumorerkrankungen besitzt. Untersuchungen an zahlreichen Tumorentitäten, wie beispielsweise am Mamma-, Lungen- oder Schilddrüsenkarzinom, konnten diese diagnostische Wertigkeit bereits belegen (Konno et al., 2014; Kuasne et al., 2013; Mavrakis et al., 2011).

Neben der Erstellung von tumorspezifisch deregulierten microRNA-Signaturen konnten in den vergangenen Jahren zunehmend auch *metastamiRs* mit tumoreigener Ausrichtung identifiziert werden, unter anderem für das Mamma-, Zervix- und Prostatakarzinom (Kuasne et al., 2013; Varambally et al., 2008; Xu et al., 2014). Diesen *metastamiRs* kommt eine besondere Bedeutung zu, da ihre Bestimmung im Rahmen der Früherkennung von (Fern-) Metastasen über diagnostische Engpässe hinweghelfen könnte. Denn die frühe Erkennung einer Metastasierung ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden diagnostischen Mitteln nur begrenzt möglich. Da der Metastasierungsstatus auch beim Peniskarzinom prognoseentscheidend ist, wäre die Möglichkeit einer Früherkennung mittels microRNA-Bestimmung wegweisend für den Einsatz früherer und aggressiverer Therapieregime und damit unter Umständen prognoseverbessernd.

Neben der diagnostischen stellt auch die therapeutische Nutzung tumorspezifischer microRNA-Profile eine aussichtsreiche, aber bislang lediglich auf präklinische Studien begrenzte Möglichkeit dar. Sowohl die Inhibition von microRNAs mit onkogener Funktion, als auch die Wiederherstellung bzw. Vervielfältigung von microRNAs mit tumorsuppressiver Wirkung stellen einen therapeutischen Ansatz dar und wurden bereits am Tiermodell mithilfe einer auf Oligonukleotiden basierenden Therapiestrategie erprobt. Dabei wurden künstlich hergestellte und mit den Sequenzen natürlicher microRNAs übereinstimmende Nukleotide mithilfe von Nanopartikeln und Vektoren in die Zellen eines murinen Xenotransplantats überführt, wo sie das Tumorwachstum des Neuroblastoms nachweislich verhindern konnten (Berindan-Neagoe et al., 2014; Volinia et al., 2006). Diesbezügliche Ergebnisse sind vielversprechend und deuten auf das Potential möglicher therapeutischer Einsatzmöglichkeiten hin.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von der geringen Inzidenz des Peniskarzinoms in westlichen Industrienationen sind im Vergleich zu anderen Tumorentitäten nur wenige biologische und molekulare Mechanismen dieses Malignoms erforscht. Dies führt zu bisher unzureichenden Kenntnissen über dieses Karzinom und zu nicht zufriedenstellenden Therapieansätzen mit nur schwacher Evidenzlage, insbesondere in Bezug auf systemtherapeutische Behandlungen (Protzel et al., 2013). Obgleich der positive inguinale Nodalstatus betroffener Patienten den wichtigsten prognostischen Faktor darstellt, ist seine diagnostische Detektion weiterhin erschwert. Weder bildgebende und nuklearmedizinische, noch minimal-invasive Verfahren verfügen bisher über ausreichende Sensitivität und Spezifität, um als sichere Methode für die Diagnose einer bereits erfolgten Lymphknotenmetastasierung fungieren zu können (Graafland et al., 2010; Pizzocaro et al., 2010).

In den vergangenen Jahren ist die Untersuchung von microRNAs zu einem bedeutenden Thema in der Tumorforschung herangewachsen. Ihre Beteiligung an der Initiation und dem Metastasierungsprozess von Krebserkrankungen ist mittlerweile unumstritten. Ihr Potential als Biomarker für eine Früherkennung sowie die Detektion von Metastasen wurde in Bezug auf zahlreiche Tumorentitäten nachgewiesen (Berindan-Neagoe et al., 2014). In diesem Zusammenhang wurde der Begriff der *metastamiR* geprägt, einer microRNA, welche maßgeblich an der systemischen Aussaat von Tumorzellen beteiligt ist und deren Expression eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung bzw. das Metastasierungspotential eines Tumors erlaubt.

Über die an der Metastasierung des Peniskarzinoms beteiligten microRNAs ist bisher noch nichts bekannt. Es liegen zwar vereinzelte Expressionsstudien vor, diese konnten jedoch keine konkreten Hinweise auf metastasierungs-relevante microRNAs liefern. Vor diesem Hintergrund lag der primäre Schwerpunkt dieser Arbeit in der Durchführung eines umfangreichen microRNA-Screenings von metastasierten und nicht-metastasierten Primärtumoren. Damit sollte eine erste Übersicht über das Expressionsmuster einer Vielzahl von microRNAs des Peniskarzinoms geschaffen werden. Ausgehend von gewonnenen Ergebnissen wiederum sollten metastasierungsrelevante microRNAs identifiziert und ihre Funktion als Onkogen bzw. Tumorsuppressor definiert werden. Ihre Eignung als mögliche Metastasierungs- bzw. prognostische Marker sollte anschließend experimentell validiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es microRNAs zu identifizieren, die als neue molekulare, diagnostische und prognostische Marker beim Peniskarzinom dienen können. Diese könnten die Grundlage einer schnelleren und früheren Erkennung von Metastasen und damit den Ausgangspunkt effizienterer und prognoseverbessernder Therapien darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Instrumente

Gerätename	Geräteart	Hersteller
Axiovert 40C	Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
Axiovert 25	Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
Celloshaker	Schüttler	Renner GmbH (Dannstadt)
Centrifuge 5417R	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5415D	Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Flex Cycler	Thermozykler	Analytik Jena
Hera Cell 240	CO ₂ -Inkubator	Heraeus (Osterode)
HBO 50	Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
Hera Safe	Zellkultur-Werkbank	Heraeus (Osterode)
iCycler	Thermozykler	Bio-Rad (München)
Julabo 5	Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach)
Leica RM2245	Mikrotom	Leica Biosystems (Wetzlar)
Mastercycler gradient	Thermozykler	Eppendorf (Hamburg)
Multifuge 3L-R	Zentrifuge	Heraeus (Osterode)
MyCycler	Thermozykler	Bio-Rad (München)
NanodropR ND1000	Spektralphotometer	PEQLAB (Erlangen)
Pico 17 Centrifuge	Tischzentrifuge	Heraeus (Osterode)
7900 HT Fast real-time PCR System	Thermozykler	Applied Biosystems® (Darmstadt)

S@flow 1.2	Zellkultur-Werkbank	Nunc (Wiesbaden)
Shaker TH15	Inkubationsschüttler	Edmund Buehler (Tübingen)
TaqMan® Array Micro Fluidic Card Sealer	Versiegeler	Applied Biosystems® (Darmstadt)
TaqMan® Array Micro Fluidic Card Thermal Cycling Block	Thermostyker-Block für TaqMan® Array Micro Fluidic Cards	Applied Biosystems® (Darmstadt)
UV Cleaner UV/CTAR	UV-Werkbank	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Vortex GENIER2	Vortexer	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA/Vereinigte Staaten)
VWR TM Galaxy Ministar	Tischzentrifuge	Van Waters & Rogers (Commerce, CA, USA/Vereinigte Staaten)

2.1.2 Chemikalien und Puffer

Sämtliche während der experimentellen Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), Bio-Rad (München), Eppendorf (Hamburg), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching, Österreich), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München). Lösungen und Puffer wurden, sofern nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook et al., 1989).

2.1.3 Kits

Name	Hersteller
Megaplex™ PreAmp Primers Pool A (10X)	Applied Biosystems® (Darmstadt)
Megaplex™ RT Primers Pool A (10X)	Applied Biosystems® (Darmstadt)
Nucleo Spin® miR	Macherey-Nagel (Düren)
Pooled TaqMan® Assay (Human pool A)	Applied Biosystems® (Darmstadt)

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation for FFPE	Ambion® (USA, Kalifornien)
TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X)	Applied Biosystems® (Darmstadt)
TaqMan® Array Human MicroRNA A Card v2.0	Applied Biosystems® (Darmstadt)
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription	Applied Biosystems® (Darmstadt)
TaqMan® PreAmp Master Mix (2X)	Applied Biosystems® (Darmstadt)
TaqMan® Small RNA Assays	Applied Biosystems® (Darmstadt)
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG	Invitrogen™ (Karlsruhe)
Megaplex™ PreAmp Primers Pool A (10X)	Applied Biosystems® (Darmstadt)

2.1.4 Zelllinien

Die in der folgenden Tabelle genannten Zelllinien des Peniskarzinoms sowie assoziierter Lymphknotenmetastasen wurden uns freundlicherweise von PD Dr. med. Carsten Maik Naumann der Klinik für Urologie und Kinderurologie des UKSH Campus Kiel zur Verfügung gestellt (Naumann et al., 2012).

Zelllinie	Beschreibung	Medium
PeCa (Ki-PeCa-P1)	humane, penile Primärtumorzelllinie	KGM 2 (C-20011; PromoCell, Heidelberg) + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml) + Supplement Mix (C-39016) + CaCl ₂ -Lösung (C-34006)
PeCa-D (Ki-PeCa-P2)	humane, penile Primärtumorzelllinie	KGM 2 (C-20011; PromoCell, Heidelberg) + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml) + Supplement Mix (C-39016) + CaCl ₂ -Lösung (C-34006)

Kilk-d (Ki-PeCa-L2)	humane, penile Lymphknotenmetastasen- zelllinie	RPMI 1640 (E15-840; Sigma- Aldrich, München) + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml) + 10 % FCS + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
Kilk-k (Ki-PeCa-L3)	humane, penile Lymphknotenmetastasen- zelllinie	RPMI 1640 (E15-840; Sigma-Aldrich, München) + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml) + 10 % FCS + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)

2.1.5 Patientenproben

Alle in dieser Arbeit untersuchten Formalin-fixierten und mittels Paraffin konservierten Patientenproben (FFPE-Proben) wurden vom Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock bereitgestellt. Sie stammen von Patienten, deren peniles Tumorgewebe zwischen 1996 und 2012 im Rahmen operativer Maßnahmen entnommen wurde. Sowohl die klinischen als auch die histopathologischen Merkmale (Tabelle 3.) wurden durch erfahrene Pathologen der Universität Rostock beschrieben und anhand operativer Ergebnisse, bildgebender Diagnostik sowie dem TNM-Schema der UICC und den EAU-Guidelines (Hakenberg et al., 2015; Maiche et al., 1991; Pizzocaro et al., 2010; Sobin, 2009) festgelegt.

Tabelle 3. Klinische und histopathologische Merkmale von FFPE-Proben der in dieser Studie einbezogenen Peniskarzinom-Patienten.

Variable	N (%)
<i>Klassifikation der Patienten</i>	
Gesamtanzahl der Patienten	24 (100)
Patienten mit nicht metastasierten Primärtumoren	11 (45,8)
Patienten mit metastasierten Primärtumoren	13 (54,2)
<i>Klassifikation der Proben</i>	
Gesamtanzahl der Proben	34 (100)
Proben nicht metastasierter Primärtumore	11 (32,4)
Proben metastasierter Primärtumore	11 (32,4)
Proben nicht-/assoziierter Metastasen	12 (35,3)
<i>Histologische Klassifikation</i>	
Klassisches Plattenepithelkarzinom	24 (100)
Verruköses, papilläres oder gemischtes Karzinom	0 (0)
<i>Histologisches Grading</i>	
Grad I	7 (29,2)
Grad II	6 (25,0)
Grad III	7 (29,2)
NA*	4 (16,7)
<i>T-Stadium</i>	
1	3 (12,5)
2	12 (50,0)
3	4 (16,7)
4	1 (4,2)
NA*	4 (16,7)
<i>N-Stadium</i>	
0	8 (33,3)
1	4 (16,7)
2	8 (33,3)
3	0 (0)
NA*	4 (16,7)
<i>M-Stadium</i>	
0	19 (79,2)
1	1 (4,2)
NA*	4 (17,6)

* NA: *not available*/nicht verfügbar

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Arbeitstechniken

2.2.1.1 RNA-Isolierung aus FFPE-Gewebeproben

Die RNA-Isolierung aus den FFPE-Proben erfolgte mithilfe des RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE der Firma Ambion. Entsprechend den Angaben des Herstellers und unter Verwendung eines Mikrotoms wurden zunächst zwei bis vier 20 µm dicke Schnitte eines jeweiligen Gewebeblocks angefertigt. Durch Waschen der auf Objektträgern getrockneten und erwärmten Schnitte mit 100 %igem Xylol wurde zunächst eine Deparaffinisierung vorgenommen und durch die anschließende Behandlung mit 100 %igem Ethanol eine Entfernung von Xylol-Rückständen. Die zuvor von Pathologen der Universität Rostock als tumorös markierten Bereiche der Gewebeschnitte wurden anschließend sorgfältig mit einer sterilen Nadel entfernt und in ebenfalls sterile 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Um die durch die Formalin-Fixierung entstandenen kovalenten Bindungen zwischen Proteinen und der benötigten RNA zu lösen, wurde zusätzlich ein Protease-Verdau durchgeführt. Mithilfe verschiedener Waschschrte sowie der Anwendung von Filtersäulen wurden RNA und DNA voneinander getrennt, und die RNA nach Versetzen mit DNase aufgereinigt. Nach Elution in 30–60 µl RNase-freiem Wasser sowie Zugabe von 20 U RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot) wurde die jeweilige RNA-Probe mithilfe spektroskopischer Messungen auf Konzentration und Reinheit geprüft. Anschließend wurde sie für weitere Expressionsanalysen verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2 MicroRNA-Isolierung aus Zelllysaten

Für die Extraktion der microRNA aus dem Zelllysate der einzelnen Peniskarzinom-Zelllinien wurde das Nucleo Spin® miR Kit verwendet. Die Isolierung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die aufgereinigte microRNA wurde schließlich in 30–60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und mit 20 U RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Nach Bestimmung von Konzentration und Reinheit der microRNA mithilfe eines Spektralphotometers (siehe 2.2.1.3) wurden die Isolate bei -20 °C für weitere Analysen gelagert.

2.2.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit

Die bereits erwähnte Messung von Konzentration und Reinheit der Ribonukleinsäuren erfolgte mithilfe eines Spektralphotometers. Die optische Dichte wurde dabei bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und mit der als Referenz geltenden Wellenlänge

von destilliertem Wasser verglichen. Eine Absorption von 1 entspricht in diesem Fall einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Das Verhältnis der Absorption von A260 zu A280 bestimmt das Maß der Reinheit, da Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. RNA-Proben mit einem A260/A280-Wert von 1,7–2,0 wurden als rein und damit als weiter verwertbar betrachtet.

2.2.1.4 Reverse Transkription von microRNA

Für die Durchführung quantitativer Genexpressionsanalysen auf microRNA-Ebene mittels quantitativer *real-time* PCR bedarf es zunächst der Umschreibung von RNA in cDNA. Dies wird durch die Reverse Transkription ermöglicht und wurde einerseits im Rahmen von TaqMan® MicroRNA Assays sowie andererseits für die Bereitstellung geeigneter cDNA für microRNA-Expressionsanalysen durch TaqMan® Human MicroRNA Arrays A durchgeführt. In beiden Fällen stellt der Nachweis kurzsträngiger microRNA eine besondere Herausforderung dar, welcher durch den Einsatz zielgenspezifischer Stem-Loop RT-Primer Rechnung getragen wurde. Diese Primer verlängern das 3'-Ende des jeweiligen Zielgens und erzeugen dabei ein Template, welches in TaqMan® MicroRNA Assay-basierten *real-time* PCRs weiterverarbeitet werden kann. Die Stem-Loop-Struktur der Primer bietet darüber hinaus den Vorteil, dass lediglich reife und damit biologisch aktive microRNA und nicht ihre Vorstufen (engl. *precursors*) nachgewiesen werden.

2.2.1.4.1 Reverse Transkription im Rahmen der TaqMan® Human MicroRNA Arrays

Die RT-PCR auf Basis der TaqMan® Array Human MicroRNA A Cards wurde mithilfe des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits und entsprechend den Angaben des Protokolls Megaplex™ Pools realisiert. Der verwendete Megaplex™ RT Primer Pool A stellt dabei ein vorgefertigtes Set von insgesamt 384 Stem-Loop RT-Primern dar. Diese ermöglichen die simultane Synthese einer Vielzahl von cDNAs reifer microRNA sowie vier endogener Kontrollgene. Die ebenfalls im Megaplex™ RT Primer Pool A enthaltenen Primer einer nicht-menschlichen, sondern murinen microRNA gelten als Negativkontrolle.

Für jede Patientenprobe wurde eine 7,5 µl-Reaktion in der folgenden Zusammensetzung angesetzt:

Bestandteil	Volumen pro 7,5 µl-Reaktion
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,50 µl
Megaplex™ RT Primer Pool A (10X)	0,80 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,10 µl
Reverse Transkription Puffer (10X)	0,80 µl
dNTPs mit dTTP (100mM)	0,20 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,09 µl
110 ng RNA + x µl RNase-freies Wasser	3,00 µl
Nuklease-freies Wasser	0,20 µl

Nach Überführen der Ansätze auf eine 96-well MicroAmp® Optical Reaction Plate (Applied Biosystems®, Darmstadt) wurde die RT-PCR wie in der nachfolgenden Ausführung im Thermozykler durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit/Dauer
1 (40 Zyklen)	16 °C	2 min
	42 °C	1 min
	50 °C	1 s
2	85 °C	5 min
3	4 °C	∞

Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert und für weitere Arbeiten im Rahmen quantitativer Genexpressionsanalysen herangezogen.

2.2.1.4.2 Reverse Transkription im Rahmen der TaqMan® MicroRNA Assays

Die RT-PCR im Rahmen der TaqMan® MicroRNA Assays wurde nach dem Protokoll TaqMan® Small RNA Assays und ebenfalls mithilfe des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits durchgeführt. Für jede Patientenprobe wurden vier Ansätze angefertigt, jeweils drei mit dem spezifischen 5X RT Primer für die microRNAs *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* sowie je einer mit dem 5X RT Primer für den Nachweis von *RNU6B* als endogene Kontrolle. Pro Ansatz wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, die sich aus denselben Inhaltsstoffen zusammensetzte, ausgenommen von RNA (engl. *no template control*; *NTC*).

Der Ansatz der insgesamt 15 µl umfassenden RT-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteil	Volumen pro 15 µl-Reaktion
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,00 µl
TaqMan® Small RNA Assay Primer	3,00 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
Reverse Transkription Puffer (10 X)	1,50 µl
dNTPs mit dTTP (100mM)	0,15 µl
10 ng RNA + x µl RNase-freies Wasser	5,00 µl
Nuklease-freies Wasser	4,16 µl

Unter folgenden Bedingungen wurde anschließend die Reverse Transkription im Thermozykler durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit/Dauer
1	16 °C	30 min
2	42 °C	30 min
3	85 °C	5 min
4	4 °C	∞

Im Anschluss an die Reverse Transkription wurde die gewonnene cDNA bei -20 °C gelagert oder direkt für weitere Expressionsanalysen mittels qRT-PCR verwendet.

2.2.2 DNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1 Quantitative real-time PCR - TaqMan® Human MicroRNA Arrays

Die qRT-PCR mithilfe von TaqMan® Human MicroRNA Arrays A (oder auch TaqMan® Low Density Arrays Human Pool A) ist eine sehr effiziente sowie sensitive und spezifische Methode, die es erlaubt, in einem Durchlauf die Expressionslevel hunderter microRNAs sowie geeigneter endogener Kontrollen einer einzelnen Probe zu erfassen. Ergebnisse dieser Form der *real-time* PCR basieren auf der Aussendung und Detektion von Fluoreszenzsignalen, welche im Anschluss an jeden PCR-Zyklus gemessen werden und ein Maß für die Expressionshöhe des jeweiligen PCR-Produktes darstellen.

Die zuvor präamplifizierte cDNA einer jeweiligen Patientenprobe wurde dabei auf eine 384-well microfluidic card (Array A) (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgetragen. Diese microfluidic card ist eine maschinell vorgefertigte 384-well-Platte, deren *wells* schon zuvor mit den einzelnen TaqMan® Genexpressions-Assays – d. h. mit den Stem-Loop qRT-Primern – von 377 microRNAs, von einer murinen Negativkontrolle sowie von 4 endogenen Kontrollgenen beladen wurde. Unter Verwendung des Thermozykler-Blocks für TaqMan® Array Micro Fluidic Cards kann diese microfluidic card die qRT-PCR im Thermozykler 7900 HT Fast real-time PCR System durchlaufen.

2.2.2.1.1 Präamplifikation von microRNA-cDNA

Vor Beginn der qRT-PCR wurde nach dem Protokoll Megaplex™ Pools und mithilfe der Megaplex™ PreAmp Primer (Pool A) eine Präamplifikation der zuvor gewonnenen cDNA durchgeführt. Dieser Schritt ist nicht obligat, erhöht allerdings die Sensitivität der Ergebnisse bei Proben mit geringer RNA-Ausbeute, weshalb er an dieser Stelle auch unter folgendem Versuchsansatz durchgeführt wurde:

Bestandteil	Volumen pro 25 µl-Reaktion
TaqMan® PreAmp Master Mix (2X)	12,50 µl
Megaplex™ PreAmp Primer Pool A (10X)	2,50 µl
cDNA-Template	2,50 µl
Nuklease-freies Wasser	7,50 µl

Unter folgenden Bedingungen wurde die Präamplifikations-PCR im Thermozykler durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit/Dauer
1	95 °C	10 min
2	55 °C	2 min
3	72 °C	2 min
4 (12 Zyklen)	95 °C	15 s
	60 °C	4 min
5	99,9 °C	10 min
6	4 °C	∞

Im Anschluss an die PCR wurde jedes Präamplifikat mit 75 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt und entweder bei -20 °C gelagert oder direkt im Rahmen der qRT-PCR weiterverarbeitet.

2.2.2.1.2 Quantitative *real-time* PCR

Die qRT-PCR wurde ebenfalls entsprechend den Angaben des Herstellers sowie mithilfe der eingangs (siehe Abschnitt 2.2.2.1) beschriebenen 384-well microfluidic cards (Array A) durchgeführt.

Pro Patientenprobe wurde ein TaqMan® Low Density Array verwendet, welcher mit dem wie folgt beschriebenen insgesamt 900 µl umfassenden Reaktionsansatz beladen wurde:

Bestandteil	Volumen pro 900 µl-Reaktion
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, ohne UNG	450,00 µl
Verdünntes PreAmp-Produkt	9,00 µl
Nuklease-freies Wasser	441,00 µl

Jeweils 100 µl dieses Reaktionsgemisches wurden in einen von insgesamt acht Array-Eingängen gegeben. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C sowie sorgfältiger Versiegelung des Arrays mithilfe des TaqMan® Array Micro Fluidic card sealers (optical adhesive cover) wurde die qRT-PCR im TaqMan® Thermozykler durchgeführt.

Die Auswertung gewonnener Expressionsdaten wurde mithilfe der Sequence Detector Software SDS 2.3 (Applied Biosystems, USA) sowie des RQ Managers 1.2 (Applied Biosystems, USA) vorgenommen. Entsprechend den Empfehlungen von Applied Biosystems® erfolgte die Analyse unter Setzung einer automatischen *baseline* (Detektion der Hintergrundfluoreszenz) sowie eines Schwellen-Wertes von 0,2 (im exponentiellen Abschnitt des *amplification plots*) über alle Arrays. Letzteres ist notwendig, um die spätere Vergleichbarkeit aller Proben innerhalb einer Studie gewährleisten zu können. Nach Beurteilung der Amplifikationskurven wurden die Ct-Werte (*cycle threshold*) aller microRNAs überprüft. Der Ct-Wert beschreibt dabei jenen PCR-Zyklus, bei dem erstmalig der *baseline*-Wert überschritten wird. Nach Beurteilung verschiedener auf dem Array mitgeführter Kontrollgene auf ihre Eignung als endogene Kontrolle fiel die Wahl auf *RNU6B*, deren Expression in allen Versuchsreihen die geringsten Schwankungen aufwies. Die anschließende Berechnung relativer Expressionslevel erfolgte anhand der endogenen Kontrolle *RNU6B* (ΔCt), sowie einer als Kalibrator festgelegten Probe ($\Delta\Delta Ct$). Die angewandte $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Formel: $2^{-\Delta\Delta Ct}$) liefert dabei die relativen Expressionswerte einer jeweiligen microRNA, normalisiert zur endogenen Kontrolle und relativ zum gewählten Kalibrator.

Nachfolgend durchgeführte statistische Analysen wurden mithilfe des Programms Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt und graphische Darstellungen mithilfe der Software Gene Cluster 3.0 (open source Software, entwickelt durch Michael Eisen, Stanford) sowie Java TreeView (open source Software, entwickelt durch Michael Eisen, Stanford) generiert (De Hoon et al., 2004).

2.2.2.2 Quantitative *real-time* PCR - TaqMan® MicroRNA Assays

Die auf TaqMan® MicroRNA Assays basierende qRT-PCR ist ebenfalls eine effiziente und sensitive Methode, um die kurzsträngigen cDNA-Templates reifer und damit biologisch aktiver microRNA zu detektieren und zu quantifizieren. Die zuvor mittels der reversen Transkription in cDNA umgeschriebenen microRNAs wurden in je dreifacher Ausführung pro Probe untersucht. Darüber hinaus wurde pro Assay eine Negativkontrolle mitgeführt, welche dieselben Bestandteile aufwies, mit Ausnahme des

cDNA-Templates. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteil	Volumen pro 20 µl-Reaktion
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, ohne UNG	10,00 µl
TaqMan® Small RNA Assay (20X)	1,00 µl
cDNA-Template	1,33 µl
Nuklease-freies Wasser	7,67 µl

Nach Übertragung der 20 µl-Ansätze auf eine 96-*fast-well*-Platte wurde die qRT-PCR im TaqMan® Thermozykler unter folgenden Zyklus-Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit/Dauer
1	95 °C	10 min
2	95 °C	15 s
3	60 °C	60 s

Die anschließende Auswertung detektierter microRNA-Expressionslevel erfolgte ebenfalls mithilfe der Sequence Detector Software SDS 2.3 (Applied Biosystems, USA) sowie des RQ Managers 1.2 (Applied Biosystems, USA). Nach Sichtung der Amplifikations-Graphen sowie Vereinheitlichung des Schwellenwertes über alle Proben wurde die Normalisierung unter Zuhilfenahme der $\Delta\Delta C_t$ -Methode – wie schon in Abschnitt 2.2.2.1.2 aufgeführt – gegen die Expressionswerte der endogenen Kontrolle *RNU6B* vorgenommen.

Anschließend durchgeführte statistische Analysen sowie graphische Darstellungen wurden mithilfe des Programms Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) ausgeführt.

2.2.3 Zellkulturarbeiten und funktionelle Analysen

2.2.3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (siehe Tabelle 2.1.4) erfolgte in Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe (25 cm² und 150 cm²) und zusammen mit dem jeweiligen Nährmedium in Zellinkubatoren bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre. Dem Nährmedium einer jeweiligen Zelllinie wurden folgende Zusätze hinzugefügt: 12,3 ml Supplement Mix, 60 µl CaCl₂-Lösung (0,5 M), 10 % FCS, 1x MEM *non-essential amino acids* (PAA, Pasching, Österreich), 100 µg/ml Penicillin, 1,25 µg/ml Amphotericin B und 100 U/ml Streptomycin. Nach Erreichen einer ausreichend hohen Zelldichte (nach 2–4 Tagen) wurden die Zellen unter der sterilen Werkbank passagiert. Dazu wurden die Zellen nach vorsichtiger Entnahme des Mediums zunächst mit 5–10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA versetzt. Nach 5- bis 10-minütiger Inkubation bei 37 °C hatten sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen gelöst und wurden in 4–6 ml frischen Nährmediums aufgenommen, resuspendiert und bei 1400 rpm für 10 min (4 °C) abzentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde daraufhin erneut in frischem Medium resuspendiert und in entsprechenden Anteilen in neuen Kulturflaschen mit 5–10 ml vorgelegtem Nährmedium ausgesät.

2.2.3.2 Zellernte

Für die Gewinnung eines Zellpellets als Ausgangssubstanz für RNA-Isolierungen oder zur vorübergehenden Lagerung bei -20 °C wurden die am Boden einer Kulturflasche adhärent wachsenden Zellen zunächst mithilfe eines Zellschabers gelöst. Die so entstehende Zellsuspension wurde dann in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 1400 rpm (4°C) zentrifugiert.

2.2.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte in Vorbereitung auf die Durchführung von Funktionsassays (Matrigel® Invasions Assays) mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer). Nach Waschen und Trypsinieren der jeweiligen Zellkultur wurden die Zellen in 10 ml des entsprechenden Nährmediums resuspendiert und für 10 min bei 1400 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde abgesaugt und das zurückbleibende Zellpellet je nach Größe in 3–10 ml FCS-freiem RPMI bzw. KGM ohne SM-Anteil gelöst. Dieser Mediumwechsel war von besonderer Bedeutung für die anschließenden Funktionsanalysen. 40 µl der gewonnenen Zellsuspension wurden daraufhin mit 40 µl einer 0,5 %igen Trypanblaulösung vermengt, um vitale und avitale Zellen lichtmikroskopisch

unterscheiden zu können. 10 µl dieses Aliquots wurden dann auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen, und die nicht gefärbten vitalen Zellen in vier Quadranten gezählt. Die durchschnittliche Anzahl an Zellen pro Milliliter ließ sich durch folgende Formel berechnen:

$$(\text{Zellzahl in 4 Quadranten} : 4) \times 10.000$$

2.2.3.4 Kulturelle Funktionsanalyse mithilfe des Matrigel® Invasion Assays

2.2.3.4.1 Funktionsweise des Matrigel® Invasion Assays

Der Matrigel® Invasion Assay oder auch Boyden-Chamber-Assay ist eine *in vitro* Methode, mit der die Migrationseigenschaften und damit das invasive Verhalten einer Tumorzelllinie gemessen und quantifiziert werden kann. Zwei mit Medium verschiedener Nährstoffkonzentrationen gefüllte Räume werden dabei durch eine porenhaltige Polykarbonatmembran sowie eine darüber befindliche Matrigel® Matrix voneinander getrennt. Nur invasive Zellen sind in der Lage, die Matrigel® Matrix zu verdauen und somit in das untere Kompartiment zu gelangen. Durch die verschiedenen Nährstoffkonzentrationen wird ein Konzentrationsgradient zwischen beiden Räumen geschaffen und ein chemotaktischer Reiz erzeugt, der die zur Invasion fähigen Zellen durch das Matrigel® hinweg in das untere Kompartiment mit der höheren Nährstoffkonzentration wandern lässt.

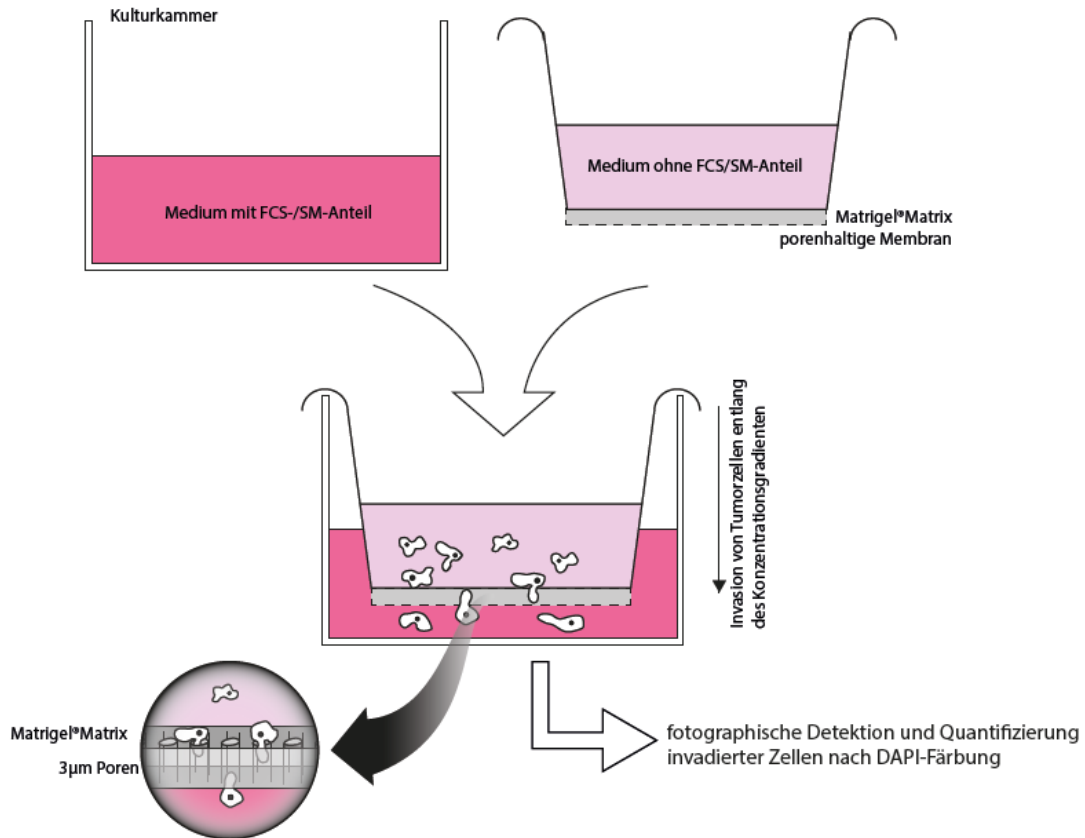


Abb. 3: Aufbau und Funktionsweise des Matrigel® Invasion Assays. Mithilfe dieser *in vitro* Methode werden die Migrations- und damit invasiven Eigenschaften von Tumorzellen detektierbar. Zwei durch eine porenhaltige Polykarbonatmembran sowie eine darüber befindliche Matrigel® Matrix getrennte Räume sind dabei mit Medium verschiedenen Nährstoffgehalts gefüllt. Der dadurch erzeugte Konzentrationsgradient zwischen beiden Räumen schafft einen chemotaktischen Reiz, welcher zu Migration und Invasivität befähigte Zellen in das untere Kompartiment mit der höheren Nährstoffkonzentration wandern lässt. Nach Durchwanderung der Matrigel® Matrix sowie der porenhaltigen Membran werden entsprechende Zellen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI angefärbt und anschließend mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert und quantifiziert.

Die Proteinmatrix des Matrigels® stellt dabei ein *in vitro* Korrelat der Basalmembran dar, einer physiologischen Barriere für die Migration von Zellen im menschlichen Körper. Maligne Tumorzellen sind durch ihre invasiven Eigenschaften dennoch in der Lage, diese Barriere zu verdauen und damit zu überwinden, welches die Grundlage des Metastasierungsprozesses darstellt. Mithilfe des Matrigel® Invasion Assays kann diese Fähigkeit zur Invasivität von Tumorzellen gemessen und quantifiziert werden.

2.2.3.4.2 Durchführung des Matrigel® Invasion Assays

Zur Herstellung der Matrigel® Matrix im Sinne einer *in vitro* Basalmembran wurde das Matrigel® (BD Matrigel™ Basement Membrane Mix, 5 ml) zunächst aufgetaut, zentrifugiert und in einem Verhältnis von 1:3 mit FCS- bzw. SM-freiem Medium vermengt. Auf jedes der sechs Inserts wurden dann 400 µl dieses Ansatzes gleichmäßig aufgetragen, und die Inserts anschließend für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die sechs *wells* einer Zellkulturplatte wurden dann jeweils und in Abhängigkeit der jeweiligen Zelllinie mit 3 ml RPMI mit 30 %igem FCS-Anteil oder 3 ml KGM mit 30 %igem SM-Anteil befüllt. Anschließend wurde je ein Zellansatz (25×10^4 Zellen) mit FCS- bzw. SM-freiem Medium bis zu einem Gesamtvolumen von 2 ml verdünnt und vorsichtig auf das nun ausgehärtete Gel auf dem Boden eines jeden Inserts pipettiert. Daraufhin wurden die Inserts in die Wells der Kulturplatte platziert und diese für 36 h (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

Im letzten Schritt nach diesen 36 h Inkubationszeit wurde das Matrigel® dann mit einem Wattestäbchen vom Boden eines jeden Inserts entfernt und die Membran mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. Die durch das Matrigel® hindurch an die Unterseite der Membran migrierten Zellen konnten so mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops photographisch erfasst und durch das Computerprogramm ImageJ quantifiziert werden.

2.2.4 Meta-Analyse zur Identifizierung differentiell exprimierter microRNA-Targets und microRNA-Regulatoren des Peniskarzinoms

Die Bestimmung von potentiell durch das identifizierte microRNA-Triplett regulierten Zielgenen erfolgte anhand bioinformatischer Analysen. Zunächst wurde unter Verwendung zweier verschiedener Datenbanken (TargetScan und miRWalk) eine erste Liste generiert, welche die Bindungswahrscheinlichkeit der microRNAs an mRNAs anhand spezifischer mathematischer Algorithmen vorhersagt und z. T. auch validierte Zielgene beinhaltet. Damit sollte ein möglichst breites Spektrum an möglichen microRNA-*targets* erfasst werden. Eine zweite Liste bestand aus transkriptionellen Regulatoren, die putativ an der Expression der identifizierten microRNAs beteiligt sind. Auch diese wurde unter Zuhilfenahme verschiedener Online-Datenbanken selektiv erstellt (TransmiR, PuTmiR, Genomatix software suite, tfbsConsFactor und TxnFactor ChIP V2 des UCSC Genome Browsers). Eine dritte und letzte Liste wiederum beinhaltete differentiell exprimierte Gene aus Transkriptomdaten von Microarray-Analysen zum Plattenepithelkarzinom des Penis (GEO database: GSE75955). Dazu wurden zunächst die log₂-Werte der Expressionsdaten aus Kontrollgewebe (Gesundgewebe) und Tumormaterial berechnet und dann in Relation zueinander gesetzt. Werte ≥ 1.0 und ≤ -1.0 innerhalb des 99 %-Intervalls definierten demnach Transkripte, die eine signifikante und mind. um das 2-fache veränderte Expression zwischen Kontrollgewebe und Tumormaterial aufwiesen. Mit den anschließenden vergleichenden Analysen durch Kombination der jeweiligen Listen wurden relevante Kandidaten identifiziert, die

einerseits potentiell durch die microRNAs miR-1, miR-101 und miR-204 reguliert werden oder andererseits die microRNA-Expression steuern könnten.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* als potentiell metastasierungsrelevante microRNAs des Peniskarzinoms

3.1.1 Vergleich der microRNA-Expressionsmuster metastasierender und nicht metastasierender Primärtumore – TaqMan® Low Density Arrays

Die molekularbiologische Relevanz von microRNAs bei der metastatischen Aussaat verschiedener Tumorentitäten ist bereits bekannt. Kenntnisse über Mechanismen, welche den nodalen Befall durch das Peniskarzinom begünstigen, fehlen jedoch. Ausgehend davon sollten zunächst speziell für Plattenepithelkarzinome des Penis bedeutsame *metastamiRs* an einer geringeren Probenanzahl identifiziert werden. Für die initial geplante quantitative Expressionsanalyse standen sechs metastasierte sowie sechs nicht metastasierte Primärtumore zur Verfügung. Die gewonnenen Ergebnisse sollten als grober Wegweiser für weitere Untersuchungen dienen.

In Vorbereitung auf die qRT-PCR mittels TaqMan® Human MicroRNA Arrays wurde die zu diesem Zweck aus FFPE-Proben isolierte RNA zunächst – unter Verwendung spezieller Stem-Loop RT-Primer (Pool A) sowie des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits – in cDNA transkribiert. Die sich anschließende Präamplifikation der gewonnenen cDNA wurde ebenfalls mithilfe speziell vorgefertigter Primer (Pool A) sowie eines dafür geeigneten TaqMan® PreAmp Master Mixes durchgeführt. Dieser Schritt diente dem Zweck einer Erhöhung der Sensitivität der Endergebnisse bei initial nur geringer RNA-Ausbeute aus den lediglich 20 µm messenden Schnitten der Formalin-fixierten Gewebeblöcke.

Die präamplifizierte cDNA einer jeweiligen Patientenprobe wurde dann in einem 900 µl-Ansatz und unter Verwendung des TaqMan® Universal PCR Master Mix II auf eine 384-well microfluidic card (Array A) aufgetragen. Dieser schon zuvor maschinell mit den Stem-Loop qRT-Primern der zu untersuchenden microRNAs (inklusive endogener Kontrollen sowie einer murinen microRNA als Negativkontrolle) beladene Array wurde dann zum Durchlauf der qRT-PCR in den Thermozykler 7900 HAT überführt.

Nach Auswertung gewonnener Ct-Werte mithilfe der SD Software 2.3 sowie des RQ Managers 1.2 erfolgte unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode deren Normalisierung anhand der endogenen Kontrolle *RNU6B*. Im Vergleich der relativen Expressionslevel von metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren erwiesen sich insgesamt 62 microRNAs als signifikant reprimiert und damit als möglicherweise bedeutsam im

Rahmen einer Funktion als *metastamiRs* (Abb. 4). Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem Mann-Whitney U-Test (oder auch Rangsummentest) ermittelt, welcher als wichtiges statistisches Verfahren für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben gilt, über deren Merkmalsverteilung in der Grundgesamtheit nur wenige oder keine Kenntnisse existieren. Damit kann er auch auf sehr kleine Stichproben, wie es bei dieser Versuchsreihe der Fall war, angewandt werden (Kundt und Krentz, 2009).

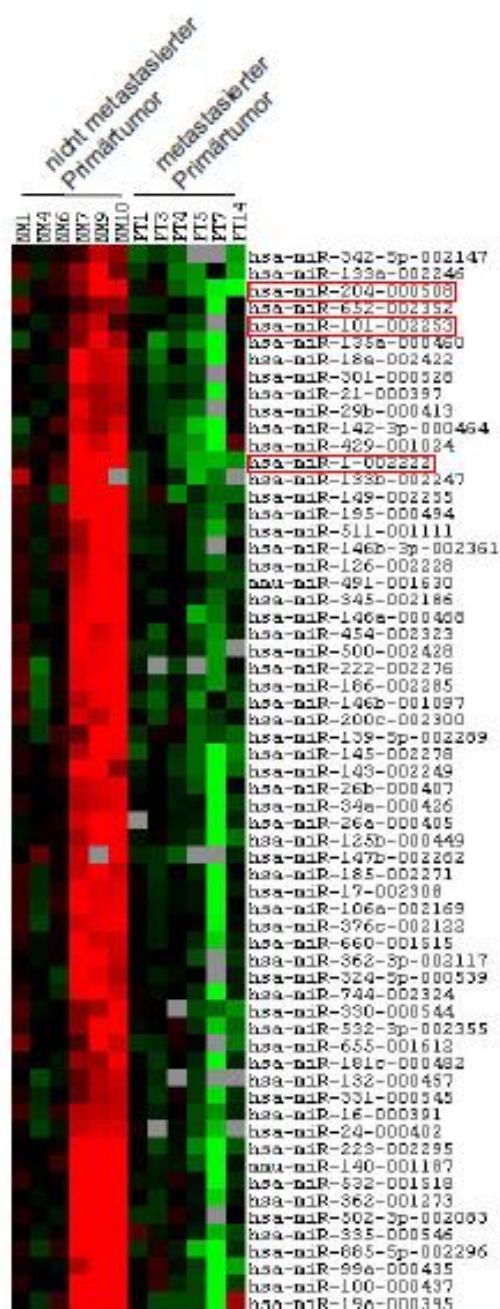


Abb. 4: Identifikation von insgesamt 62 microRNAs als mögliche *metastamiRs* des Peniskarzinoms. Mithilfe der TaqMan® Human MicroRNA Arrays wurde das microRNA-Profil sechs metastasierter sowie sechs nicht metastasierter Primärtumore des Peniskarzinoms erstellt. Beide Gruppen vergleichend illustriert die gezeigte *heatmap* die mithilfe des Mann-Whitney U-Tests ermittelte signifikante Repression von 62 der insgesamt 384 untersuchten microRNAs. Die Expressionslevel aller microRNAs wurden mithilfe der SD Software 2.3 sowie des RQ-Managers 1.2 ermittelt. Relative Expressionslevel ergaben sich durch Normalisierung anhand der endogenen Kontrolle *RNU6B* sowie unter Anwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Erstellung der *heatmap* selbst erfolgte unter Anwendung der Programme Gene Cluster 3.0 sowie Java TreeView. Die grüne Schattierung repräsentiert eine Unter-, die rote Schattierung eine Überexpression der jeweiligen microRNA. Graue Bereiche wiederum bezeichnen die fehlende Expression einer microRNA. Die rote Markierung hebt *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* hervor, welche in darauffolgenden Versuchsreihen einbezogen wurden.

Wie bereits eingangs erläutert, weist das Peniskarzinom zahlreiche Parallelen zu den weitaus intensiver erforschten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs auf. Ein Vergleich der oben angeführten 62 microRNAs mit jenen, welche in der Vergangenheit schon bei Kopf-Hals-Tumoren als relevante Tumorsuppressoren identifiziert wurden, ergab unter anderem *miR-1*, *miR-101* sowie *miR-204* als *tumorsuppressormiRs* mit möglicher Bedeutung für den Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms. Diese wiesen unter der auf diese Weise eingegrenzten Gruppe von microRNAs die höchste statistische Signifikanz auf (Abb. 5). Vor diesem Hintergrund wurden nachfolgend durchgeführte Versuchsreihen auf dieses microRNA-Triplett beschränkt.

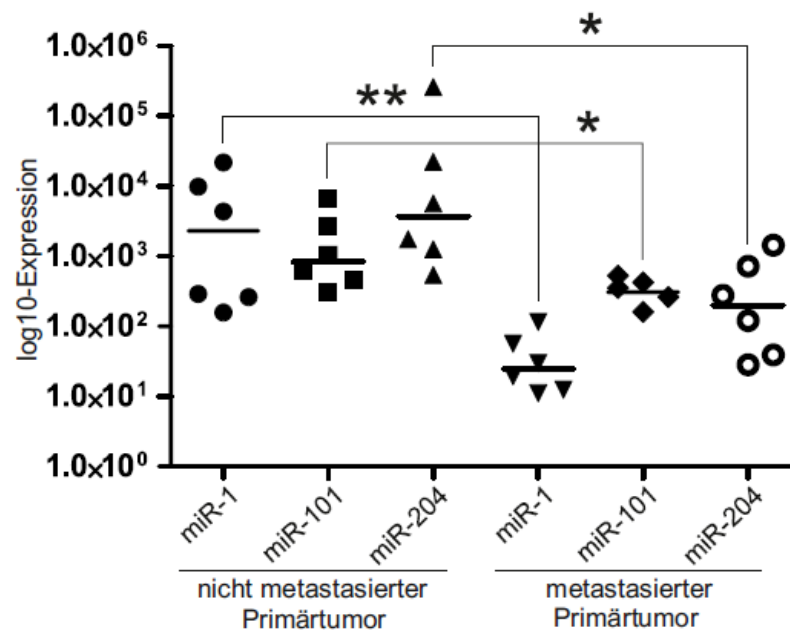


Abb. 5: Ergebnis des Mann-Whitney U-Tests: *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* als mögliche tumorsuppressiv wirkende *metastamiRs* des Peniskarzinoms. Im Vergleich zwischen metastasierten ($n = 6$) und nicht metastasierten Primärtumoren ($n = 6$) zeigen sich *miR-1* (** $p < 0,01$), *miR-101* (* $p < 0,05$) und *miR-204* (* $p < 0,05$) signifikant geringer exprimiert. Damit verfügen sie möglicherweise über eine tumorsuppressive Funktion im Rahmen des Metastasierungsprozesses des Peniskarzinoms.

3.1.2 Validierung der Expressionslevel von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* mittels TaqMan® MicroRNA Assays

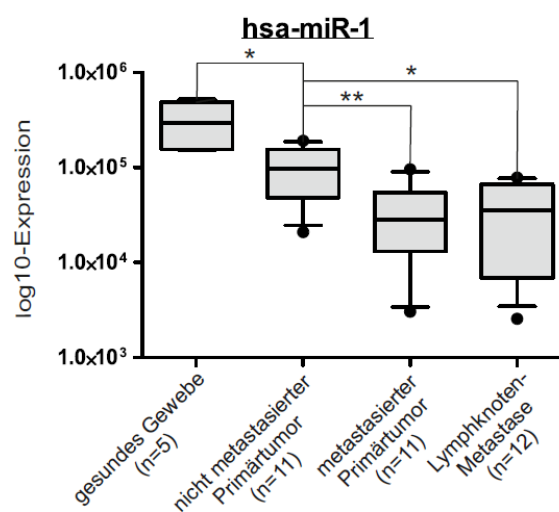
Trotz limitierter Verfügbarkeit geeigneter Patientenproben, welche nicht zuletzt auf die geringe Inzidenz des Peniskarzinoms in Deutschland zurückzuführen ist, sollten die im Anschluss an die Auswertung der TaqMan® Human MicroRNA Arrays gewonnenen Ergebnisse an einer größeren Anzahl von Proben validiert werden. Dies erfolgte mithilfe der unter 2.2.2.2 beschriebenen TaqMan® MicroRNA Assays. Neben jeweils

11 metastasierten und nicht metastasierten Primärtumorgeweben wurden diese Analysen darüber hinaus auch an Normalgewebe (gesundem plattenepithelialen Gewebe) sowie an Formalin-fixierten Proben assoziierter Lymphknotenmetastasen durchgeführt.

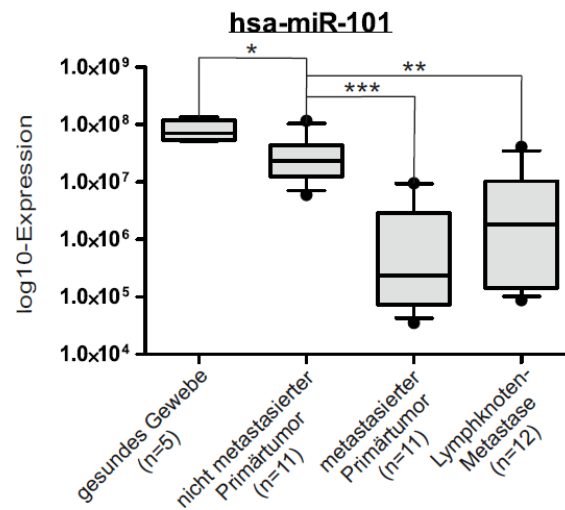
Analog zur Vorbereitung auf die qRT-PCR mittels TaqMan® Human MicroRNA Arrays wurde die aus den FFPE-Proben isolierte RNA mithilfe des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits zunächst in cDNA transkribiert. Die sich anschließende qRT-PCR wurde für jede Patientenprobe 4-mal durchgeführt: jeweils drei Ansätze mit den spezifischen 5X RT Primern zum Nachweis der microRNAs *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* sowie ein Ansatz mit den 5X RT Primern zum Nachweis von *RNU6B* als endogene Kontrolle.

Die Ergebnisse der TaqMan® Human MicroRNA Arrays bestätigend, zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* in metastasierten verglichen mit nicht metastasierten Primärtumoren (Abb. 6, A – C). Hierdurch wird die Hypothese unterstützt, dass es sich bei den drei microRNAs möglicherweise um tumorsuppressiv wirkende *metastamiRs* bzw. Metastasierungssuppressoren handelt. Darüber hinaus wiesen auch assoziierte Lymphknotenmetastasen eine im Vergleich zu nicht metastasierten Primärtumoren deutlich reduzierte Expression aller drei microRNAs auf. Die Annahme einer tumorsuppressiven Funktion von *miR-1* und *miR-101* wurde zuletzt dadurch untermauert, dass in jedem der untersuchten tumorösen Gewebe, verglichen mit Normalgewebe, eine signifikant geringere Expression nachweisbar war (Abb. 6, A und B).

A



B



C

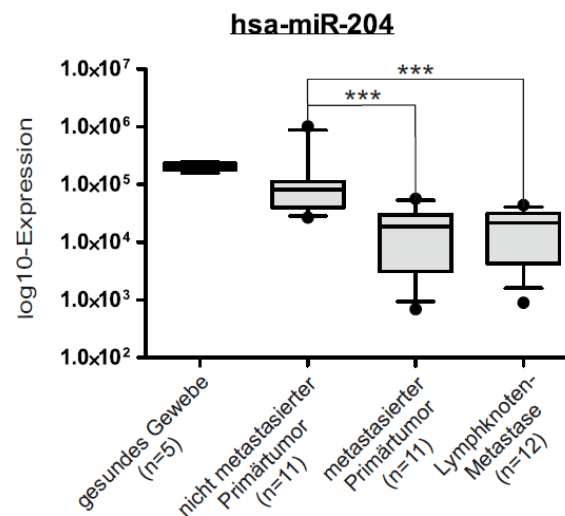


Abb. 6: Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* in metastasierten Primärtumoren und assoziierten Lymphknotenmetastasen verglichen mit nicht metastasierten Primärtumoren und Normalgewebe. (A) *MiR-1* zeigt sich signifikant unterexprimiert in metastasierten Primärtumoren (p < 0,01) sowie assoziierten Lymphknotenmetastasen (*p < 0,05), verglichen mit nicht metastasierten Primärtumoren. Daneben weist *miR-1* eine signifikante Repression in nicht metastasierten Primärtumoren im Vergleich zu Normalgewebe auf (*p < 0,05). (B) *MiR-101* ist in metastasierten Primärtumoren (***p < 0,001) und assoziierten Metastasen (**p < 0,01), verglichen mit nicht metastasierten Primärtumoren, signifikant herunterreguliert. Auch zwischen letzteren und gesundem Gewebe zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des normalisierten Expressionslevels (*p < 0,05). (C) Verglichen mit nicht metastasierten Primärtumoren und gesundem Gewebe erweist sich *miR-204* in metastasierten Primärtumoren (***p < 0,001) sowie assoziierten Lymphknotenmetastasen (***p < 0,001) als hoch signifikant reprimiert (der besseren Übersicht wegen ist der Vergleich zum gesunden plattenepithelialen Gewebe in der Abbildung nicht dargestellt).**

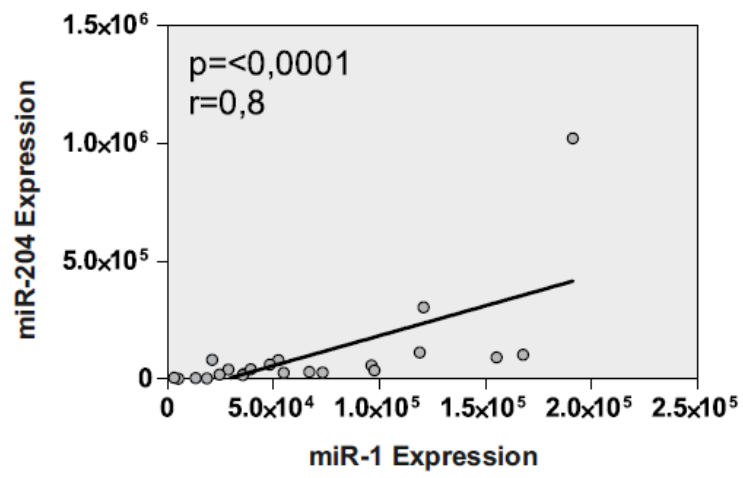
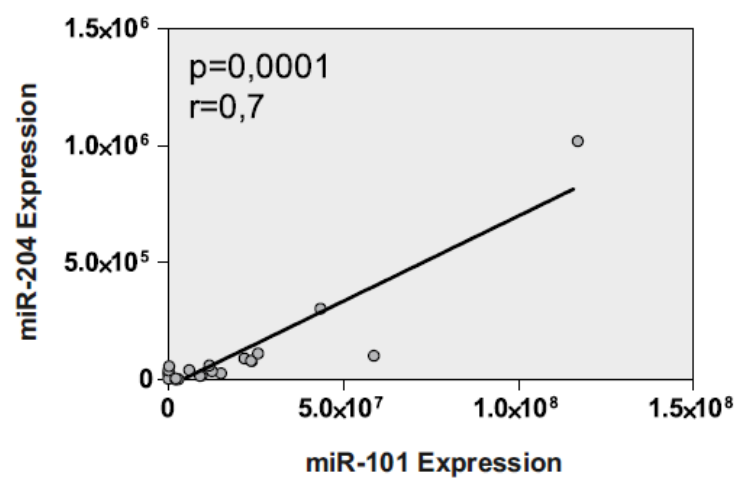
3.2 Korrelation differentiell regulierter microRNAs in Assoziation mit Überlebensraten von Patienten

3.2.1 Die wechselseitige Korrelation der Expressionslevel von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* lässt Veränderungen eines regulatorischen Netzwerkes auf transkriptioneller Ebene vermuten

Die anhand der TaqMan® MicroRNA Assays gewonnenen Ergebnisse galten als Grundlage für die nun folgende Korrelationsanalyse der drei als potentiell metastasierungsrelevant (bzw. als metastasierungssuppressiv wirkend) identifizierten microRNAs *miR-1*, *miR-101* und *miR-204*.

Mithilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman wurde untersucht, inwiefern die Expressionslevel der einzelnen microRNAs innerhalb eines Patienten korrelieren, d. h., ob eine starke Expression von *miR-1* beispielsweise mit einer starken Expression einer der anderen zwei microRNAs einhergeht oder umgekehrt. Der Rangkorrelationskoeffizient ist dabei ein unabhängiges Maß für den Zusammenhang zweier Variablen, in diesem Fall der normalisierten Expression jeweils zweier microRNAs eines Patienten. Der Korrelationskoeffizient r kann dabei Werte zwischen -1 (perfekte negative Korrelation) und +1 (perfekte positive Korrelation) annehmen. Liegt der Wert nahe oder bei 0, so liegt keine Korrelation bzw. keine wechselseitige Abhängigkeit vor. In die Analyse wurden Patienten mit nicht metastasiertem ($n = 11$) und Patienten mit primär metastasiertem Tumorleiden ($n = 11$) einbezogen.

Im Ergebnis zeigte sich eine positive Korrelation zwischen allen drei microRNAs. Weist ein Patient damit ein erhöhtes Expressionslevel von *miR-1* auf, so gilt dies auch für *miR-101* und *miR-204*. Ob der Tumor dabei primär metastasiert ist oder nicht, scheint dabei keine Rolle zu spielen. Die stärkste Korrelation zeigte sich dabei zwischen *miR-1* und *miR-204* ($r = 0,8$, $p < 0,0001$; Abb. 7A), gefolgt von *miR-101* und *miR-204* ($r = 0,7$, $p = 0,0001$; Abb. 7B) sowie *miR-1* und *miR-101* ($r = 0,6$, $p = 0,0031$; Abb. 7C).

A**B**

C

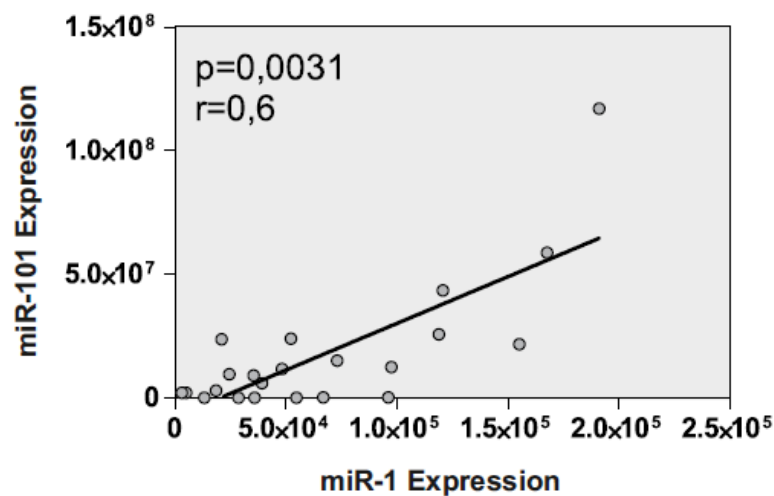


Abb. 7: Die wechselseitige Korrelation der Expressionslevel von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204*. Die statistisch signifikante positive Korrelation aller drei microRNAs lässt einen gemeinsamen regulatorischen oder funktionellen Zusammenhang vermuten. Die Korrelation wurde mithilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman anhand der normalisierten Expressionslevel von 11 primär metastasierten und 11 nicht metastasierten Primärtumoren berechnet. Die Expressionslevel sind in linearer Skalierung dargestellt. **(A)** Die stärkste Korrelation zeigt sich im Vergleich der microRNAs *miR-1* und *miR-204* ($r = 0,8$, $***p < 0,0001$). **(B)** Wie die Gegenüberstellung der Expressionslevel von *miR-101* und *miR-204* ($r = 0,7$, $***p = 0,0001$), **(C)** erwies sich auch der Vergleich von *miR-1* und *miR-101* als signifikant ($r = 0,6$, $**p = 0,0031$).

Die positiven Korrelationen der Expressionswerte der drei microRNAs lassen einerseits die Veränderungen durch ein gemeinsames regulatorisches Netzwerk auf transkriptioneller Ebene vermuten und andererseits auch einen potentiell funktionellen Zusammenhang. Auf Grundlage der Ergebnisse erfolgten anschließend Promotoranalysen des microRNA-Triplets zur Identifizierung gemeinsamer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Unter Zuhilfenahme der Datenbanken TransmiR, PuTmiR und ENCODE (TF ChIP-seq.) sowie der aus dem UCSC Genome Browser erhaltenen konservierten Bindungsstellen wurde schließlich eine Liste von validierten und potentiellen Transkriptionsregulatoren erstellt. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Regulatoren wurden schließlich Transkriptom-Daten aus Peniskarzinomgewebe von insgesamt 39 Patienten verwendet und mit der Liste der putativen Transkriptionsfaktoren abgeglichen (Kuasne et al., 2015). Aus dieser Analyse ergaben sich interessanterweise 19 reprimierte Kandidaten, die als transkriptionelle Aktivatoren fungieren, sowie 5 hochregulierte Faktoren, die als transkriptionelle Repressoren klassifiziert sind. Zu letzteren zählen unter anderem die PRC2-Komplex-Komponente und Methyltransferase *EZH2* sowie auch Mitglieder der E2F-Familie *E2F7/8* (Abb. 8A und B).

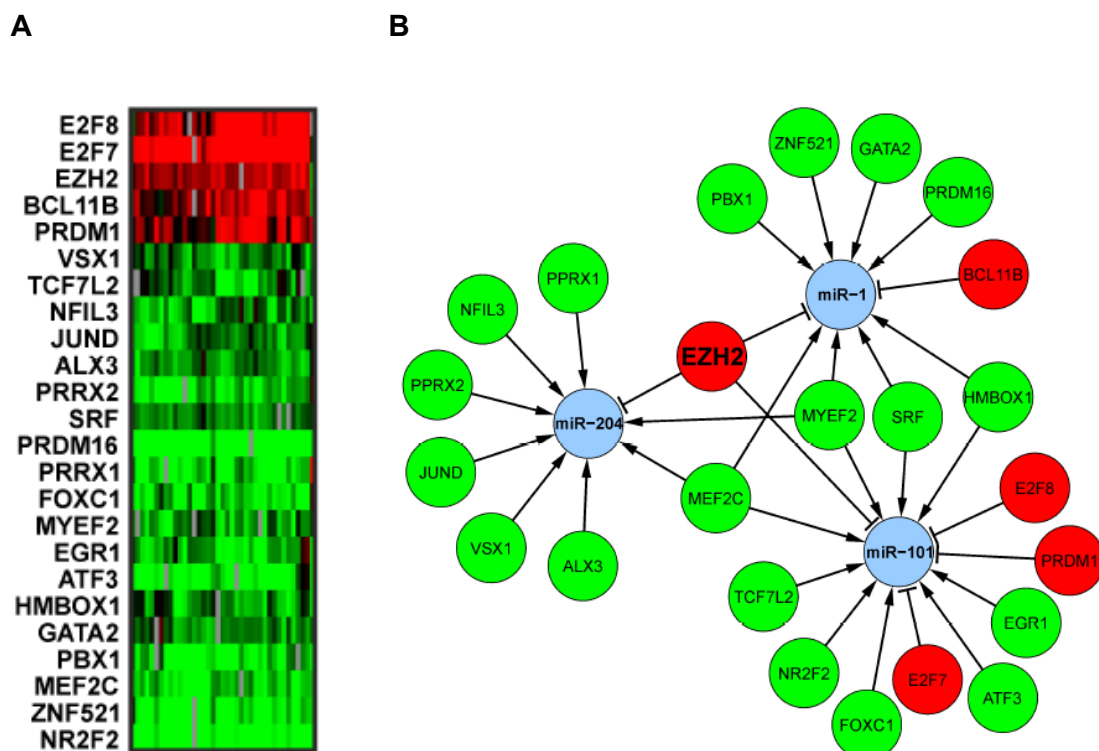


Abb. 8: Mögliche transkriptionelle Aktivatoren und Repressoren von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204*. (A) Die *heatmap* zeigt die differentielle Expression potentieller Transkriptionsfaktoren des microRNA-Triplets, validiert anhand von 39 Gewebeproben von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Penis. (B) Das regulatorische Netzwerk der Transkription von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* ist hier dargestellt in Form eines *cytoscape*-Graphs. Die grüne Schattierung repräsentiert reprimierte und die rote Schattierung überexprimierte Faktoren jeweils im Vergleich zum Normalgewebe der *Glans penis*. Blau dargestellt sind die microRNAs, während Pfeile auf eine aktivierende Funktion und Balken auf eine Inhibition derselben hindeuten.

Die beobachteten molekularen Abweichungen des regulatorischen Netzwerks auf transkriptioneller Ebene mögen ein Grund sein für den integrierten Verlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* und damit im weiteren Sinne für die Progression und Metastasierung des Peniskarzinoms.

3.2.2 Der Verlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* ist assoziiert mit der Deregulation gemeinsamer Zielgene und einer schlechteren Prognose für Patienten

Bisherige Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die geringere Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* in direktem Zusammenhang mit dem Metastasierungsstatus des Peniskarzinoms steht. Nach wie vor stellt das Vorhandensein inguinaler Lymphknotenmetastasen den wichtigsten prognostischen Faktor für betroffene Patienten dar (Hakenberg et al., 2015; Maiche et al., 1991; Pizzocaro et al., 2010). In Kenntnis der Überlebenszeiten der Patienten, welche in diese Studie eingeschlossen wurden, sollte daher untersucht werden, inwieweit auch die integrierte

Überexpression bzw. der gemeinsame Expressionsverlust dieses microRNA-Tripletts eine prognostische Vorhersage über das krankheitsspezifische Überleben zulässt. Hierzu wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven angefertigt. Die Schätzung der Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier stellt eine standardisierte statistische Methode zur Analyse von Überlebenszeiten dar und eignet sich besonders für Studien mit kleiner Patientenzahl (Kundt und Krentz, 2009).

Die erhöhte bzw. verminderte Expression einer microRNA wurde dabei durch den jeweiligen Median aller mithilfe der TaqMan® MicroRNA Assays ermittelten Expressionslevel einer microRNA definiert. Die auf diese Weise ermittelten Überlebenskurven von Patienten mit einer simultanen Überexpression bzw. Repression (Abb. 9) aller drei microRNAs wurden anschließend unter Anwendung des Logrank-Tests verglichen. Dieser Test überprüft, ob die beobachteten Unterschiede beider Kurven nur zufallsbedingt, oder aber signifikant und damit auf die Grundgesamtheit übertragbar und verallgemeinerbar sind (Kundt und Krentz, 2009).

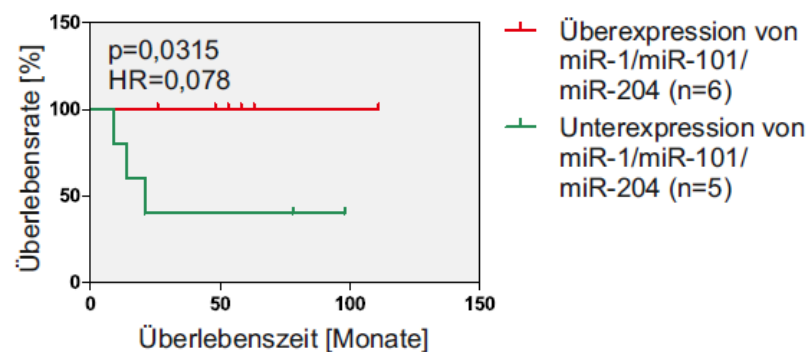
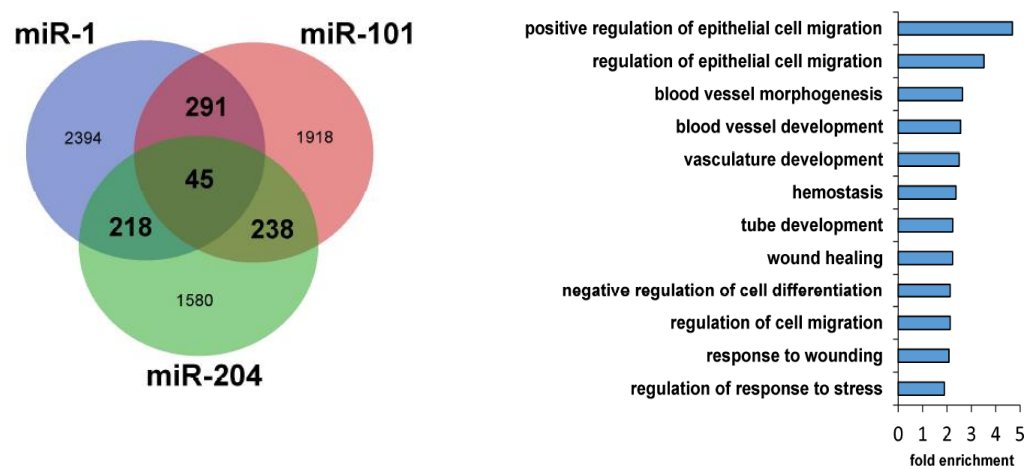


Abb. 9: Die geringere Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose. Die Grafik zeigt zum einen die Überlebenskurve jener Patienten (n=6), welche eine Überexpression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* aufwiesen (rot) und zum anderen die Überlebenskurve der Patienten (n=5) mit einer reprimierten Expression dieses microRNA-Tripletts (grün). Die Bezeichnung Über- bzw. Unterexpression wurde dabei durch den Median aller mithilfe der TaqMan® MicroRNA Assays ermittelten Expressionslevel einer jeweiligen microRNA definiert. Im Logrank-Test, welcher beide Überlebenskurven miteinander vergleicht, zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil der Patienten mit einer kombinierten Überexpression aller drei microRNAs (*p = 0,0315, HR = 0,078).

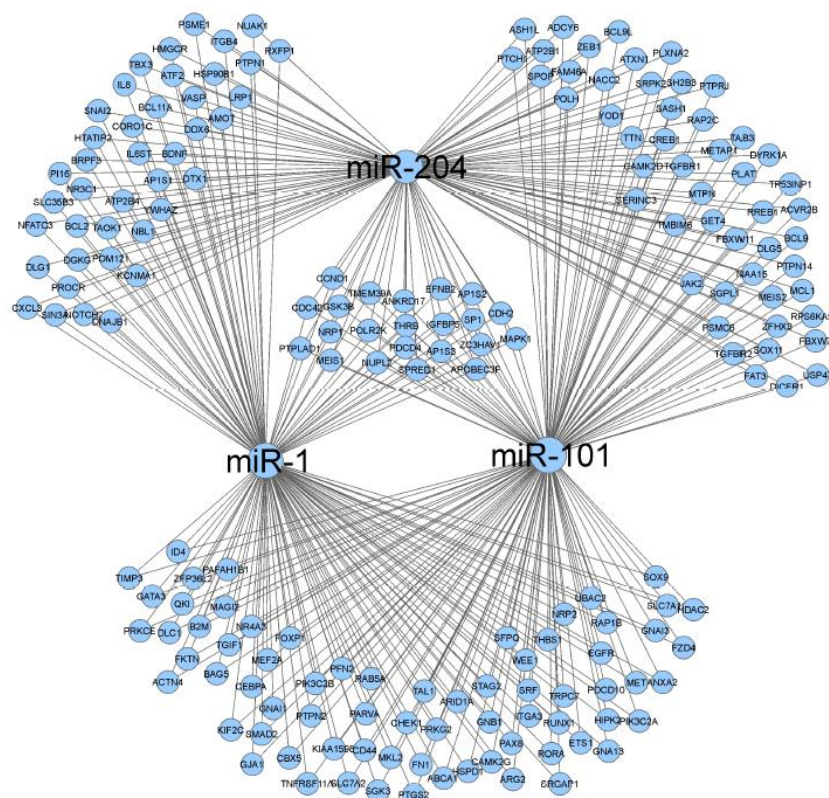
Der Vergleich beider Überlebenskurven mithilfe des Logrank-Tests ergab einen signifikanten Überlebensvorteil der Patienten, die eine gemeinsame Überexpression aller drei microRNAs *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* (p = 0,0315, HR = 0,078) aufweisen gegenüber der Patientengruppe mit niedrigen Levels der drei microRNAs. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Bestimmung der Expression dieses microRNA-Tripletts als prognostischer Marker für betroffene Patienten dienen könnte.

Für ein besseres Verständnis der funktionellen Auswirkungen des Expressionsverlustes von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* wurden in einer darauffolgenden Analyse mithilfe der Datenbanken TargetScan und miRWalk gemeinsame Zielgene identifiziert. Diese experimentell validierten und prognostizierten Ziel-mRNAs waren dabei mindestens zu einem Paar der drei microRNAs assoziiert (Abb. 10A, links). Eine anschließende *in silico* gestützte Anreicherungsanalyse der zuvor identifizierten Kandidaten hinsichtlich der *gene ontology* (GO) Klassifizierung ergab, dass 189 der insgesamt 792 potentiellen Zielgene maßgeblich assoziiert sind mit Zellmigration und Angiogenese (Abb.10A, rechts und 10B). Das vorrangige Fokussieren des microRNA-Tripletts auf Gene, welche den Metastasierungsprozess unterstützen, spiegelt wiederum deren gemeinsame anti-metastatische Funktion wider. Gemeinsam mit den Microarray-Daten von Patienten und dieser pro-metastatischen Gen-Signatur ließ sich damit eine Untergruppe von Zielgenen definieren, welche eine Hochregulation im Peniskarzinom aufweist. Interessanterweise war bereits schon im Vorfeld eine Vielzahl der Vertreter dieser Signatur mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (YWHAZ, ITGA3, SOX9, SOX11, CHEK1, MCL1, IL8), Fernmetastasen (RUNX1, SLC7A11, CXCL3) und Zellmigration (CDC42) in verschiedenen Tumorentitäten assoziiert worden. Diese Ergebnisse deuten eingehend daraufhin, dass durch den kombinierten Verlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* eine Suppression von Genen hervorgerufen wird, deren fehlende Aktivierung den Metastasierungsprozess vorantreibt. In Verbindung mit dem Expressionslevel des microRNA-Tripletts kann dies als prognostische Signatur für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Penis herangezogen werden.

A



B



C

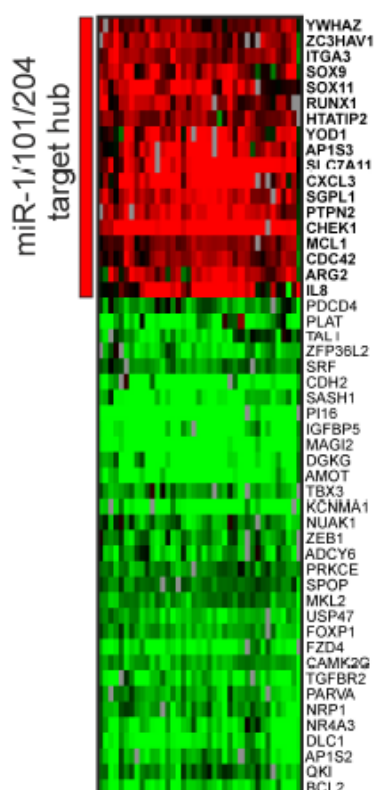


Abb. 10: Putatives gemeinsames Netzwerk aus prognostizierten Zielgenen von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204*. (A) Das Venn-Diagramm zeigt die absoluten Zahlen validierter und prognostizierter Zielgene der einzelnen microRNAs während in der Überschneidung jeweils die Anzahl gemeinsamer Kandidaten dargestellt sind (links). Die GO-Anreicherungsanalyse der insgesamt 792 gemeinsamen Zielgene ergab eine starke Assoziation zu biologischen Prozessen, welche mit dem Metastasierungsprozess von Tumoren einhergehen (rechts). (B) Der *cytoscape network-graph* veranschaulicht die Untergruppe aus 189 gemeinsamen Zielgenen, welche per GO-Klassifizierung in den Prozessen der Zellmigration und Angiogenese angereichert waren. (C) Das Transkriptom-Profil der mithilfe von cDNA-Arrays untersuchten Peniskarzinom-Gewebeproben zeigt die differentielle Expression der microRNA-Zielgene. Die in dieser *heatmap* dargestellte rote Schattierung repräsentiert eine Hochregulation, die grüne Schattierung eine Repression der entsprechenden Gene verglichen mit normalem Glans-Gewebe.

3.3 Charakterisierung neu etablierter Peniskarzinomzelllinien hinsichtlich microRNA-Expression und Invasivität

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien des Peniskarzinoms wurden von PD Dr. med. Carsten Maik Naumann und Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalkhoff der Klinik für Urologie und Kinderurologie des UKSH Campus Kiel zur Verfügung gestellt. Ihnen und ihrer Arbeitsgruppe war es als ersten gelungen, zwei Zelllinien eines einzelnen Peniskarzinoms, nämlich die des Primärtumors sowie die einer assoziierten inguinalen Lymphknotenmetastase, zu etablieren. Darüber hinaus wurden zwei weitere Zelllinien anderer Patienten errichtet, die eines weiteren metastasierten Primärtumors und die einer nicht assoziierten Lymphknotenmetastase (Naumann et al., 2012).

3.3.1 Verstärkte Invasivität von humanen PeCa-Zelllinien, die aus Lymphknotenmetastasen des Peniskarzinoms etabliert wurden

Die funktionelle Untersuchung von Krebszelllinien ist unentbehrlich für ein besseres Verständnis ihrer metastasierungsfördernden Eigenschaften und diesen zugrunde liegenden Mechanismen. In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits ein deutlicher Einfluss von E2F1 auf das migratorische Verhalten der Zelllinien beobachtet werden (Fenner et al., 2017). Für die Untersuchung der microRNA-Expressionslevel war es nötig, neue Kulturen der Zelllinien anzulegen und diese zunächst auf ihre invasiven Eigenschaften mittels Boyden-Chamber-Assays zu überprüfen.

Der Boyden-Chamber-Assay stellt eine *in vitro* Methode dar, mit der die Migrationseigenschaften und damit das invasive Verhalten einer Tumorzelllinie bestimmt und quantifiziert werden kann. Untersucht wird die Fähigkeit kultivierter Zellen, auf einen chemotaktischen Reiz hin durch eine synthetisch hergestellte extrazelluläre Matrix zu wandern. Die Anzahl der migrierten und damit zur Invasion befähigten Zellen ist dabei ein Maß für deren invasives Potential. Nach 36-stündiger Inkubation der Matrigel® Invasionskammer wurden die migrierten Zellen mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt, um die invadierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop quantifizieren zu können.

In den beiden Zelllinien der inguinalen Lymphknotenmetastasen (Kilk-k, Kilk-d) ließ sich eine signifikant stärkere Invasivität und damit deutlich vermehrte Migration der Zellen im Vergleich zu den Primärtumorzelllinien (PeCa, PeCa-D) nachweisen ($p < 0,0001$). Hinsichtlich der Zellmotilität zwischen den Zelllinien der Primärtumoren (PeCa vs. PeCa-

D) bzw. den Metastasen (Kilk-k vs. Kilk-d) konnten hingegen keine Unterschiede beobachtet werden (Abb. 11 A–C).

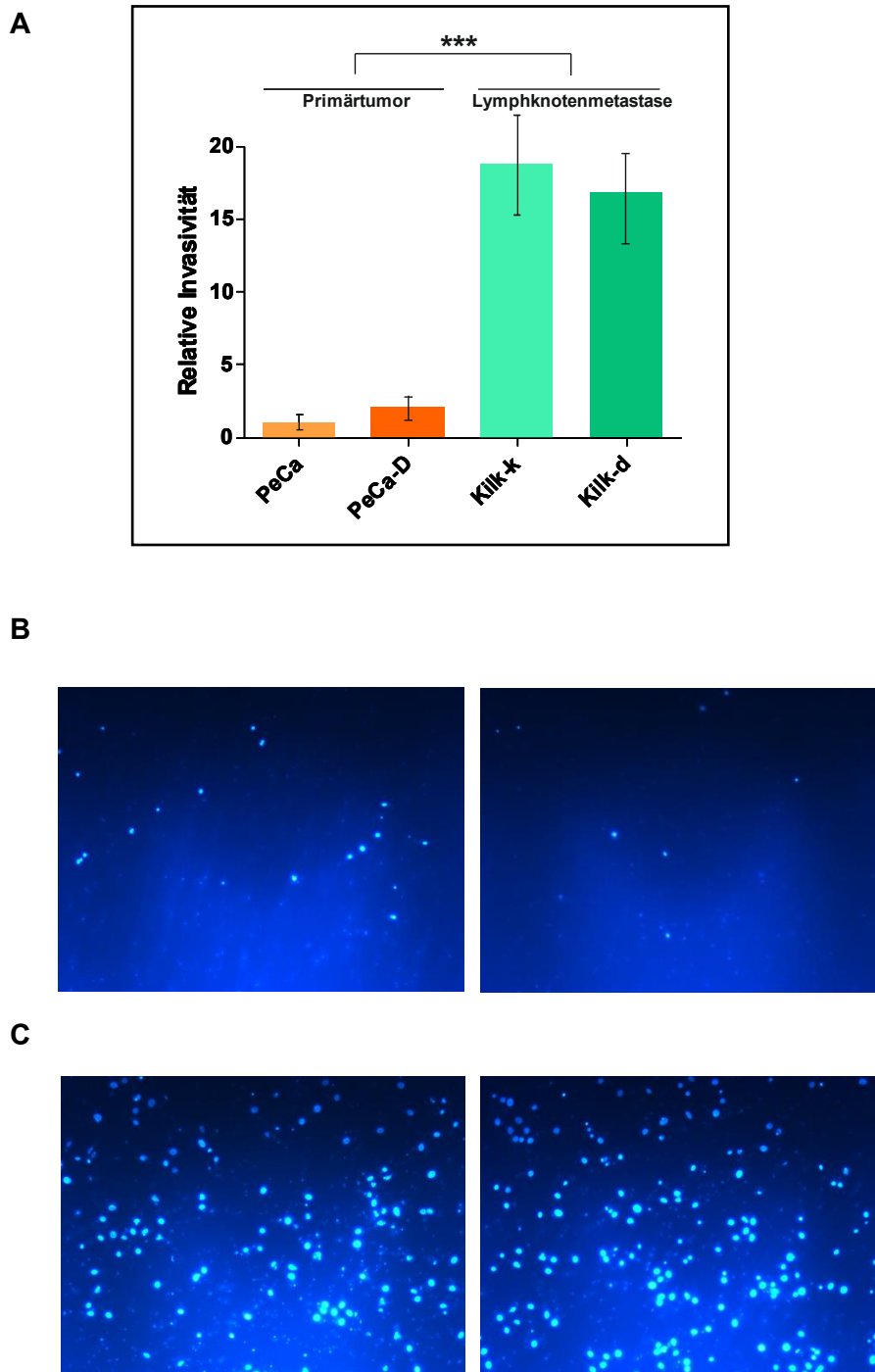


Abb. 11: Invasionsassay der vier etablierten Peniskarzinom-Zelllinien. (A) Die relative Zellinvasion der Zelllinien inguinaler Lymphknotenmetastasen (Kilk-k, Kilk-d) ist im Vergleich zu Primärtumorzelllinien des Peniskarzinoms (PeCa, PeCa-D) signifikant erhöht ($***p < 0,0001$). Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mithilfe des T-Tests. **(B)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen DAPI-gefärbter invadierter Zellen der Primärtumorzelllinien (PeCa, links; PeCa-D, rechts) **(C)** sowie der Linien Kilk-k (links) und Kilk-d (rechts).

Damit konnten diese Zelllinien als repräsentatives Modell für die verwendeten PeCa-Gewebeproben von Patienten betrachtet werden und waren somit auch geeignet für die nachfolgenden Analysen bezüglich der microRNA-Expression.

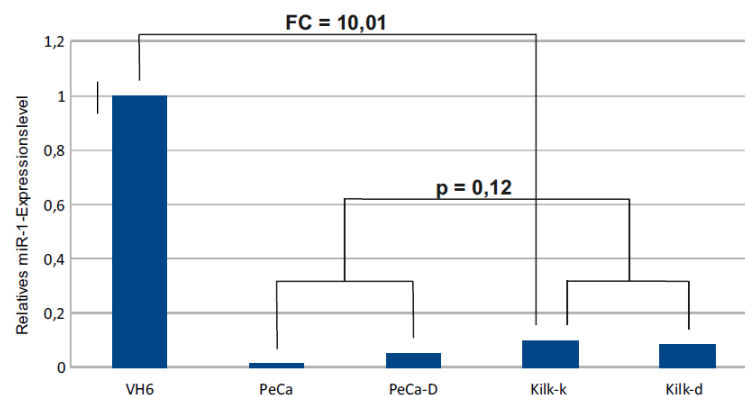
3.3.2 Analyse der Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* in PeCa-Zelllinien

Ziel dieses Versuchsabschnitts war es, die zuvor aus Versuchen an Formalin-fixiertem Gewebe gewonnenen Ergebnisse zum microRNA-Triplett in Zelllinien metastasierter Primärtumore sowie befallener Lymphknoten zu validieren. Da es bisher nicht gelungen war, eine Zelllinie aus nicht metastasierten Primärtumoren zu etablieren, beschränkten sich folgende Analysen auf den Vergleich der Zelllinien zweier metastasierter Primärtumore (PeCa und PeCa-D) mit einer assoziierten Lymphknotenmetastase (Kilk-d) und einer nicht assoziierten Lymphknotenmetastase (Kilk-k) sowie mit gesundem plattenepithelialen Gewebe bzw. karyotypischen normalen Vorhautfibroblasten (VH6).

Nach Extraktion von microRNAs aus Zelllysaten der unter 2.1.4 aufgeführten Zelllinien mithilfe des Nucleo Spin® miR Kit wurden diese, analog zu den Versuchsreihen an FFPE-Proben, zunächst in cDNA transkribiert. Die sich anschließende qRT-PCR wurde dann erneut unter Verwendung von TaqMan® MicroRNA Assays des genannten microRNA-Triplets sowie *RNU6B* als endogene Kontrolle durchgeführt.

Relativ zum Expressionslevel in normalen Vorhautfibroblasten ließ sich sowohl in den Primärtumorzelllinien als auch in den Zelllinien assoziierter Lymphknotenmetastasen, eine deutlich geringere Expression aller drei microRNAs nachweisen (Abb. 12 A–C).

A



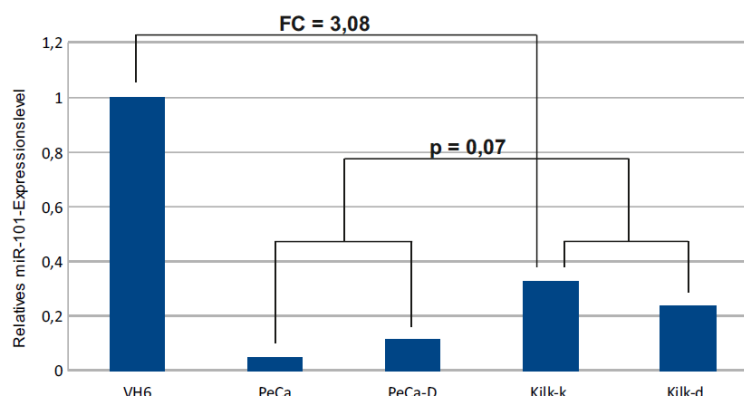
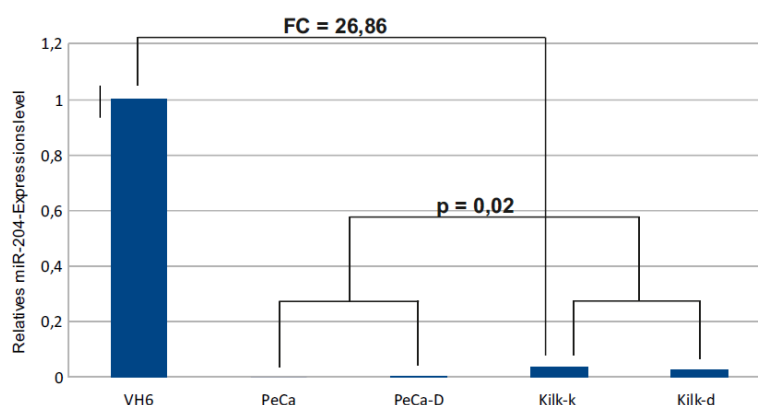
B**C**

Abb. 12: Geringere Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* in Zelllinien metastasierter Primärtumore und assoziierter Lymphknotenmetastasen. TaqMan® MicroRNA Assay-Analysen der Peniskarzinomzelllinien PeCa und PeCa-D (metastasierte Primärtumore) sowie der Zelllinien assoziierter (Kilk-d) bzw. nicht metastasierte Lymphknotenmetastasen (Kilk-k) ergaben eine deutlich geringere Expression von (A) *miR-1*, (B) *miR-101* und (C) *miR-204* relativ zum jeweiligen Expressionslevel in VH6, einer Zelllinie aus karyotypischen normalen Vorhautfibroblasten. Das Expressionslevel von Kilk-k ergab dabei für jede der drei microRNAs den minimalen fold-change (*miR-1* FC = 10,01; *miR-101* FC = 3,08; *miR-204* FC = 26,86). *miR-204* ist in Zellen der Lymphknotenmetastasen signifikant höher exprimiert als in Zellen der Primärtumore ($p = 0,02$), während sich bezüglich der Expression von *miR-1* und *miR-101* kein signifikanter Unterschied zeigt ($p = 0,12$, $p = 0,07$).

Vergleicht man die microRNA-Level in Primärtumoren und assoziierten bzw. auch nicht-assoziierten Lymphknotenmetastasen miteinander, so zeigt sich *miR-204* signifikant höher exprimiert in Zellen der Metastasen, während sich für *miR-1* und *miR-101* kein Unterschied zeigt. Dies mag einerseits – und in diesem Fall insbesondere auf den signifikanten Expressionsunterschied von *miR-204* bezogen – auf die geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden Zelllinien und damit auf die eingeschränkte Repräsentativität zurückzuführen sein. Andererseits handelt es sich bei den untersuchten Zelllinien um primär metastasierte Tumore sowie deren assoziierte

Lymphknotenmetastasen, zwischen denen analog der unter 3.1.2 gezeigten Ergebnisse ohnehin kein nennenswerter Unterschied zu erwarten gewesen wäre.

Die zuvor anhand quantitativer Expressionsanalysen an FFPE-Proben gewonnenen Ergebnisse sind damit übertragbar auf ein Zellkulturmodell. Sie können in weitergehenden Experimenten hinsichtlich ihrer Regulation und metastasierungsrelevanter Zielgene analysiert werden.

4 Diskussion

Das bei uns seltene Plattenepithelkarzinom des Penis stellt, vor allem in Ländern mit niedrigen hygienischen und sozioökonomischen Verhältnissen, ein ernsthaftes Gesundheitsproblem dar. Im Verlauf der Erkrankung ist der positive Lymphknotenbefall nach wie vor der bisher wichtigste und aussagekräftigste prognostische Faktor. Aufgrund der geringen Inzidenz in Industrienationen und dem damit einhergehenden Mangel an biologischen Proben existieren jedoch nur geringe Kenntnisse über molekulare Mechanismen, welche den Prozess der Metastasierung des Peniskarzinoms fördern und unterhalten. Molekulare Marker jedoch, die den positiven Nodalstatus bestimmen, könnten die Therapiemöglichkeiten dieser Krebserkrankung optimieren und damit die Prognose betroffener Patienten verbessern.

Untersuchungen dieser Arbeit zu metastasierungsrelevanten microRNAs haben ergeben, dass der kombinierte Verlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* nicht nur tumoröses von gesundem Gewebe, sondern auch metastasierte von nicht metastasierten Peniskarzinomen zu unterscheiden vermag. Darüber hinaus scheint die signifikant geringere Expression dieses microRNA-Tripletts mit der klinischen Überlebenszeit von Patienten assoziiert zu sein und kommt somit als möglicher prognostischer Marker in Frage.

4.1 Bedeutung von microRNAs bei der Erforschung des Peniskarzinoms

Die grundlegende Bedeutung von kleinen, nicht-kodierenden microRNAs für Karzinogenese und Progression menschlicher Tumore ist im Verlauf der vergangenen Jahre immer deutlicher geworden. Jede Tumorentität scheint eine spezifische Signatur von microRNAs zu besitzen, durch welche sie charakterisiert wird. MicroRNAs fungieren in komplexen Netzwerken. Während verschiedene microRNAs an jeweils unterschiedlichen Bereichen der 3'UTR-Zielsequenz ein und derselben mRNA binden, kommt es zu einer gezielten Dysregulation tumorrelevanter Signalwege (Fischer et al., 2015). Diesbezügliche Untersuchungen wurden an einer Vielzahl von Tumorentitäten durchgeführt. Bei Studien zur Entwicklung und Progression der T-ALL beispielsweise wurde eine relativ kleine Gruppe überexprimierter microRNAs identifiziert, welche die Expression von Tumorsuppressoren mit Schlüsselfunktion für die Karzinogenese reguliert (Mavrakis et al., 2011). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Dysregulation einiger weniger funktionell verwandter microRNAs einen wesentlichen Einfluss auf die Expression krankheitsspezifischer Gennetzwerke hat. Dies wiederum stützt den Grundgedanken, dass das gefundene microRNA-Triplett, bestehend aus

miR-1, *miR-101* und *miR-204*, in Verbindung mit der identifizierten Signatur assoziierter und differentiell exprimierter Zielgene eine wesentliche Rolle beim Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms spielt.

Ungeachtet der beschriebenen Bedeutung von microRNAs für Kanzerogenese und Progression von Tumorerkrankungen wurden bisher nur wenige Untersuchungen am Peniskarzinom durchgeführt. Kenntnisse über microRNAs, die diese Form des Plattenepithelkarzinoms charakterisieren, sind daher bisher nur gering. Muñoz et al. beschreiben die *miR-223* als eine überexprimierte microRNA im Tumorgewebe verglichen mit gesundem Plattenepithel der Glans penis. Darüber hinaus scheint das *miR-223*-Level negativ korreliert zu sein mit der Expression des potentiellen *miR-223*-Zielgens *SLC8A1*, einem Natrium-Calcium-Austauscher, der das intrazelluläre Calcium-Niveau reguliert. Der Verlust von *SLC8A1* steht in Verbindung mit niedrigen intrazellulären Calcium-Konzentrationen, einer verminderten Apoptose sowie einem Anstieg der Zellproliferation (Munoz et al., 2015). Ein Zusammenhang zwischen *miR-223/SLC8A1* und klinisch-pathologischen Merkmalen ließ sich hingegen nicht herstellen, womit dieser Signalweg als relevant für die Entstehung des Peniskarzinoms, nicht jedoch für seine Aggressivität gelten mag.

Barzon und Mitarbeiter wiederum definieren die verminderte Expression von *miR-218*, einer HPV-assoziierten microRNA, als Konsequenz eines *SLIT2*-Promotor-Silencing und als Schlüsselereignis in der Tumorgenese HPV-assoziiierter Peniskarzinome (Barzon et al., 2014). Ein positiver HPV-Nachweis findet sich bei 45 bis 50 Prozent aller invasiven Peniskarzinome und weist eine starke Korrelation zu seinem histologischen Subtyp auf (Backes et al., 2009). So lässt sich HPV-DNA vor allem im basaloiden und warzigen Subtyp des Peniskarzinoms sowie in gemischten Karzinomen nachweisen, nicht jedoch im klassischen Plattenepithelkarzinom. Dies mag der Grund für die fehlende differentielle Expression von *miR-218* in den in meiner Arbeit untersuchten Proben sein, da Untersuchungen ausschließlich am klassischen Subtyp durchgeführt wurden.

Ansätze zur Untersuchung von metastasierungsrelevanten microRNAs oder auch zur Identifikation von microRNAs mit Aussagen über das krankheitsspezifische Überleben wurden bisher nicht verfolgt, womit die Ergebnisse dieser Arbeit eine Neuheit auf dem Feld der diesbezüglichen Grundlagenforschung darstellen.

Wie bereits eingangs beschrieben wird die Tumorgenese HPV-assoziiierter Karzinome durch die Interaktion der viralen Onkogenprodukte *E6* und *E7* mit den zellulären Tumorsuppressorproteinen *p53* und *Rb* induziert (Dyson et al., 1989; Scheffner et al., 1993). Durch die daraus resultierende Störung des Zellzyklus kommt es zur malignen

Transformation der Zelle, wobei nicht jede Infektion mit einem high-risk HPV-Typ zwingendermaßen zur Tumorentstehung führen muss. 95 % aller primären Infektionen werden durch das Immunsystem eliminiert, während das onkogene Potential des Virus maßgeblich von seiner (Über-) Expression der Onkogene *E6* und *E7* abhängt (DeFilippis et al., 2003; Hoppe-Seyler et al., 2017). In den von mir untersuchten Zelllinien von klassischen Plattenepithelkarzinomen des Penis sowie assoziierten Lymphknotenmetastasen, welche primär nicht als HPV-induziert beschrieben werden, war neben einer differentiellen Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* dennoch ein positiver HPV-DNA-Nachweis vorhanden. In Anbetracht dessen, dass nicht jede HPV-Infektion die Entstehung eines Peniskarzinoms nach sich ziehen muss, ist anzunehmen, dass zwar im Fall der von mir untersuchten Proben eine entsprechende Infektion vorgelegen hat, diese aber nicht ausschlaggebend für die Tumorentstehung war. In diesem Fall war die deregulierte Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* maßgeblich involviert in Kanzerogenese und Metastasierung, womit die assoziierten Signalwege bei nicht HPV-induzierten Peniskarzinomen als äquivalente Schlüsselkaskaden verglichen mit dem *E6/E7/p53/Rb*-Signalweg für HPV-induzierte Peniskarzinome bei der Initiierung des Tumorgeschehens gelten mögen.

4.2 Vergleichende Betrachtung der untersuchten microRNAs in Plattenepithelkarzinomen verschiedener Entitäten

Die individuelle Herunterregulation von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* wurde bereits bei der Untersuchung anderer Plattenepithelkarzinome beschrieben, die dem Peniskarzinom aus pathomorphologischer Sicht verwandt sind. So ist *miR-1* in Hypopharynx- und Ösophaguskarzinomen plattenepithelialen Ursprungs gering exprimiert. Die dadurch hervorgerufene Hochregulation von *TAGLN2*, einem onkogenen Zielgen der *miR-1*, scheint neben der Zellproliferation auch die Migration und Invasivität der Tumorzellen im positiven Sinne zu beeinflussen (Nohata et al., 2011b). Ähnliche Befunde wurden anhand von *in vitro*-Versuchen am Larynxkarzinom gewonnen, in denen es durch die Abnahme der *miR-1* zur Induktion des *FN1*-Gens kommt, was zu vermehrtem Zellwachstum führt und sowohl die Migration als auch die Invasivität fördert (Wang et al., 2011). Durch die fehlende Expression der *miR-1* scheinen Onkogene, welche die Proliferation und Invasivität von Tumorzellen fördern, damit nicht mehr inhibiert zu werden.

Studien zum Nasopharynxkarzinom und weiteren Kopf-Hals-Tumoren beschreiben *miR-101* als ebenfalls relevant für die Tumorentstehung. Alajez et al. beispielsweise identifizierten *miR-101*, neben *miR-26a* und *miR-98*, als negativen Regulator von *EZH2* (Alajez et al., 2010). *EZH2* ist eine Histon-Lysin-N-Methyltransferase, welche durch Trimethylierung des Histons H3 am Lysin27 sowie durch Promotorhypermethylierung die transkriptionelle Inaktivierung von Genen hervorruft, die an der regelrechten Entwicklung und Differenzierung von Zellen sowie der Apoptose beteiligt sind. *EZH2* fungiert dabei als katalytische Untereinheit des *PRC2*-Komplexes. Sowohl *EZH2* als auch *PRC2* gelten als relevant für die Entwicklung einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten (Cao et al., 2008; Chi et al., 2010; Varambally et al., 2002). Das *EZH2*-, nicht jedoch das *miR-101*-Expressionslevel, wurde in diesem Zusammenhang auch als prognostischer Marker für das klinische Outcome entsprechender Patienten beschrieben (Alajez et al., 2010; Chang et al., 2016). Die Gruppe um Banerjee bestätigte die gefundenen Ergebnisse bezüglich einer negativen Regulation von *EZH2* durch *miR-101* anhand einer integrativen Genomanalyse verschiedener Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs. Darüber hinaus definierten sie das *rap1GAP*-Gen als Zielgen von *EZH2*. *Rap1GAP* wird beschrieben als für verschiedene Tumorarten relevanter Tumorsuppressor, der neben einer Unterdrückung der Zellproliferation auch Zellmigration und -überleben beeinflusst (Zhang et al., 2006; Zheng et al., 2009). Durch die *EZH2*- bzw. *PRC2*-vermittelte Histonmethylierung bzw. Promotorhypermethylierung wird das *rap1GAP*-Gen inaktiviert, wodurch Kanzerogenese und Metastasierung unterstützt werden (Banerjee et al., 2011). Ein niedriges Expressionslevel von *miR-101* führt dementsprechend zu einer Überexpression von *EZH2*, welches die Transkription tumorsuppressiver Gene unterbindet und dadurch wiederum zu Tumorentwicklung und -progression beiträgt.

Neben *miR-1* und *miR-101* wurde auch das Expressionslevel von *miR-204* in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs untersucht. Lee et al. beschreiben *miR-204* als Tumorsuppressor, dessen Funktionsverlust durch ein Allel-Ungleichgewicht des Lokus 9q21.1–q22.3 hervorgerufen wird. Die Genomregion 9q21.1–q22.3 wurde bereits zuvor als *cancer-associated genomic region* (CAGR) definiert, welche vor allem in Kopf-Hals-Tumoren häufig genetische und damit tumorassoziierte Veränderungen aufweist (Abou-Elhamd et al., 2008; Ah-See et al., 1994; Bauer et al., 2008). Eine im Vergleich zu Normalgewebe geringere Expression von *miR-204* war *in vitro*-Ergebnissen zufolge vergesellschaftet mit vermehrter Zellmigration, -adhäsion und Invasivität (Lee et al., 2010). Weitere Versuche an Nasennebenhöhlenkarzinomen und

Plattenepithelkarzinomen der Mundschleimhaut unterstreichen die beschriebenen Befunde und damit die Rolle von *miR-204* für die Kanzerogenese (De Sarkar et al., 2014; Nohata et al., 2011a).

Schließlich lässt sich sagen, dass alle drei microRNAs des gefundenen Triplets bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs und damit dem Peniskarzinom verwandten Tumorentitäten bereits als Tumorsuppressoren beschrieben wurden. *MIR-1* und *miR-204* scheinen zudem für den Metastasierungsprozess von Bedeutung zu sein. Alle drei scheinen dabei histopathologisch ähnliche Plattenepithelkarzinome zu charakterisieren, während die simultan geringere Expression und womöglich auch die gemeinsame Interaktion insbesondere für das metastasierte Plattenepithelkarzinom des Penis eine Rolle spielt und dieses auszeichnet.

4.3 Relevanz des microRNA-Triplets *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* für die Metastasierung des Peniskarzinoms

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, lassen sich anhand des beschriebenen microRNA-Triplets sowohl tumoröses von gesundem Gewebe, als auch metastasierte von nicht metastasierten Tumoren unterscheiden. Der positive Lymphknotenstatus von Patienten stellt nach wie vor den wichtigsten prognostischen Marker dar, und bisher existieren nur wenige Studien zur Bestimmung biologischer Marker zur Identifikation des Nodalbefalls. Die gefundene differentielle Regulation von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* ist daher bei bisher fehlenden molekularen Biomarkern für den Metastasierungsprozess beim Peniskarzinom von besonderem Interesse (Pizzocaro et al., 2010; Thoma, 2016).

In den letzten Jahren wurde bereits eine Reihe potentieller Marker für das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen identifiziert. Protzel et al. definierten eine starke Expression von *ANX AI* und *ANX AIV*, basierend auf immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 29 FFPE-Proben des Peniskarzinoms, als Marker für Invasivität und Metastasierungstendenz (Protzel et al., 2011). Annexine stellen eine große Gruppe von Calcium- und Phospholipid-Bindungsproteinen dar und spielen eine essentielle Rolle bei der Zellregeneration, -differenzierung, Proliferation und damit auch bei der Tumorgenese (Mussunoor und Murray, 2008).

Anhand einer ebenfalls nur kleinen Anzahl von 39 Patientenproben brachte die Gruppe um Minardi eine Überexpression von *D2-40* und eine niedrige intratumorale *LVD* (*lymphatic vessel density*) in Verbindung mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen sowie der Prognose für Patienten (Minardi et al., 2011). *D2-40* ist ein monoklonaler Antikörper, welcher an das transmembranöse Mucoprotein

Podoplanin bindet. Podoplanin wird selektiv vom Endothel der Lymphgefäße exprimiert. Eine Podoplanin-Überexpression wurde bereits für eine Vielzahl von Plattenepithelkarzinomen beschrieben und scheint assoziiert zu sein mit vermehrter Zellmigration sowie Tumordinvasivität (Wicki und Christofori, 2007).

Darüber hinaus scheint auch der *mTOR*-Signalweg eine Rolle für den Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms zu spielen, dessen Alterationen auch für die Entstehung weiterer Plattenepithelkarzinome von Bedeutung sind (Populo et al., 2012). *mTOR* ist eine Serin-/Threonin-Kinase, welche durch Phosphorylierung *downstream-targets* aktiviert und somit die Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie auch die Funktion des Immunsystems reguliert. Anhand einer Kohorte von 67 Patienten konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von *mTOR* sowie die eines seiner *downstream-targets*, nämlich *eIF4E*, signifikant mit einem positiven Nodalstatus korrelieren (Ferrandiz-Pulido et al., 2013).

Mithilfe einer genomweiten Array-Analyse identifizierten Feber und Kollegen wiederum eine epigenetische Signatur, bestehend aus spezifischen DNA-Loci, welche eine Vorhersage über den Metastasierungsstatus des Patienten erlaubt (Feber et al., 2015). Veränderungen des Methylierungsstatus der DNA spielen eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation von Normalgeweben, da sie zum Gen-*silencing* von Tumorsuppressoren sowie zur Überexpression von Onkogenen führen (Kulis und Esteller, 2010).

Zuletzt definierte die Arbeitsgruppe um Ball einen prädiktiven Zusammenhang zwischen der Expression des *insuline-like growth factor-1 receptor (IGF1R)* und dem Vorhandensein von regionären Metastasen sowie Fernmetastasen (Ball et al., 2016). Auch *IGF1R*, eine transmembranäre Tyrosinkinase, spielt eine essentielle Rolle für Zelldifferenzierung, -proliferation und die maligne Transformation (Baserga, 2005).

Ergebnisse weiterer Studien beschreiben einen positiven Lymphknotenstatus als signifikant korrelierend mit einem negativen *p16ink4a*-Status, dem *LOH (loss of heterozygosity)*, der Überexpression des Proliferationsmarkers *Ki-67* sowie der geringen Expression des Metastasensuppressor-Proteins *KAI1/CD82* (Poetsch et al., 2011; Poetsch et al., 2007; Protzel et al., 2008; Protzel et al., 2007).

Die in den vorherigen Absätzen beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass bereits eine Reihe potentiell bedeutsamer Ansätze bezüglich metastasierungsrelevanter Signalwege und Prozesse verfolgt wurden. MicroRNAs und insbesondere die simultan geringere Expression des beim Peniskarzinom identifizierten microRNA-Tripletts als möglicher Initiator für den Metastasierungsprozess wurden bisher jedoch nicht beschrieben.

Neben der gefundenen differentiellen Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204*, welche metastasierende von nicht metastasierenden Peniskarzinomen zu unterscheiden vermag, konnte mithilfe einer Datenbank- sowie einer sich anschließenden *Go term enrichment*-Analyse eine gemeinsame Gruppe von im Peniskarzinom überexprimierten Zielgenen definiert werden, welche mit einer Lymphgefäßinvasion bzw. Zellmigration und Gefäßneubildung in Verbindung stehen könnte (Hartz et al., 2016). Damit mag die Überexpression dieser Zielgene bedingt sein durch eine geringe Expression des microRNA-Tripletts, deren anti-metastatische Funktion dadurch verloren geht. Zu den möglichen Zielstrukturen des differentiell regulierten microRNA-Tripletts zählt unter anderem das *YWHAZ*-Protein, ein intrazellulärer Bestandteil der Signaltransduktion, welches bereits bei zahlreichen anderen Tumorentitäten als Initiator für die lymphatische Dissemination und damit als relevant für den Metastasierungsprozess beschrieben wurde. Durch die Destabilisierung von *p53*, einem intrazellulären *Smad*-Protein und damit einem *downstream*-Segment der *TGF-β*-induzierten Signaltransduktionskette, wandelt *YWHAZ* die tumorsuppressive Funktion von *TGF-β* in eine den Metastasierungsprozess initiiierende Funktion um, womit es als Schlüsselprotein bei der Progression eines nicht-invasiven Tumors in einen invasiven angesehen werden kann (Xu et al., 2015). *TGF-β* zählt zur Gruppe der Zytokine und spielt neben der embryonalen Entwicklung von Zellen eine essentielle Rolle für Zelldifferenzierung, -wachstum und auch Tumorentstehung (Massague, 2008). Ausgehend von der identifizierten Gruppe potentieller Zielgene des genannten microRNA-Tripletts und dem Wissen um die durch *TGF-β* hervorgerufene Initiierung der lymphogenen Metastasierung scheint es naheliegend, dass der Expressionsverlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* und die damit einhergehende Dysregulation des *TGF-β*-Signalweges Schlüsselereignisse bei der nodalen Metastasierung darstellen (Pang et al., 2016).

4.4 Epigenetische Mechanismen als Ursache für die korrelierende Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204*

Obgleich der Verlust der individuellen microRNAs des Tripletts, wie zuvor beschrieben, auch für die Tumorprogression anderer Plattenepithelkarzinome eine wesentliche Rolle zu spielen scheint, wurde der gemeinsame Expressionsverlust aller drei microRNAs bisher für keine andere Tumorentität beschrieben. Die signifikante Korrelation ihrer Expressionslevel mag daher Bestandteil eines für das Peniskarzinom charakteristischen Netzwerkes deregulierter und das Tumorgeschehen vorantreibender Signalwege sein. Die korrelierende Expression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* deutet darüber hinaus

auf einen regulatorischen oder auch funktionellen Zusammenhang dieser drei microRNAs hin.

Mithilfe der unter 3.2.1 beschriebenen Datenbankanalyse zu Promotoren des microRNA-Triplets und ihren Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen konnte eine Reihe differentiell exprimierter und damit potentieller und validierter Transkriptionsregulatoren, darunter 19 Aktivatoren und 5 Repressoren, identifiziert werden (Kuasne et al., 2015). Zu den transkriptionell reprimierenden Regulatoren zählen unter anderem die bereits unter 4.2 erwähnte PRC2-Komplex-Komponente und Methyltransferase *EZH2*, sowie auch *E2F7/8* als Mitglieder der E2F-Familie (Hartz et al., 2016).

Interessanterweise ist *EZH2*, als Bestandteil des *PRC2*-Komplexes, welcher zur DNA-Methylierung führt und damit ein Gen-*Silencing* hervorruft, wodurch die Transkription betroffener Gene unterbunden wird, in Plattenepithelkarzinomen des Penis generell überexprimiert. Diese Ergebnisse wurden durch eine 2015 durchgeführte genomweite epigenetische Studie zum Methylierungsstatus des Peniskarzinoms bestätigt. Feber et al. beschrieben damit ebenfalls abweichende Methylierungen von *PRC2*-Zielgenen in tumorösem gegenüber gesundem Gewebe. Diese gingen einher mit einer Überexpression von *EZH2* sowie *SUZ12*, einem weiteren Bestandteil des *PRC2*-Komplexes (Feber et al., 2015). Ähnliche Erkenntnisse zur Hypermethylierung von Genen, welche durch den *PRC2*-Komplex reguliert werden, wurden bereits anhand anderer Plattenepithelkarzinome, wie beispielsweise Kopf-Hals-Tumoren oder dem Zervixkarzinom, gewonnen (Banerjee et al., 2011; Wang et al., 2016). Durch die Ergebnisse ihrer genom-übergreifenden Methylierungsanalyse waren Feber et al. in der Lage, eine spezifische epigenetische Signatur zu beschreiben, welche den Metastasierungsstatus von Patienten definiert. Durch den Nachweis von *DMRs* (*differentially methylated regions*) in nur 4 Genen war es damit möglich, einen positiven Lymphknotenstatus mit hoher Genauigkeit (Spezifität von 100 %, Sensitivität von 92 %) vorherzusagen.

Hohe Level von *EZH2* stehen wiederum über verschiedene Signalwege in direktem Zusammenhang mit einer Repression von *miR-1* und *miR-101* (Lu et al., 2014; Wang et al., 2014). Dies zeigten auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analysen mithilfe der ENCODE TF ChIP-seq-Datenbank. Diese ergab jedoch auch Bindungsstellen für *EZH2* am Wirts-Gen von *miR-204*, was erklären könnte, warum sich in Peniskarzinomen mit niedrigen *miR-1*- und *miR-101*-Levels auch eine nur geringe Expression der *miR-204* zeigt. Interessanterweise stellt die Histon-Methyltransferase *EZH2* selbst ein Ziel von *miR-101* dar. Dadurch kommt es bei geringer Expression dieser microRNA zum Anstieg

von *EZH2*, was einen negativen Feedback-Mechanismus mit begleitender Dysregulation epigenetischer Signalwege nahelegt (Varambally et al., 2008; Wang et al., 2014). Dieser Zusammenhang konnte in einer Vielzahl weiterer Tumorentitäten nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Promotor-Hypermethylierung im Rahmen einer *EZH2*-Überexpression ein für den integrierten Verlust des beschriebenen microRNA-Tripletts und damit für die Entstehung und Progression des Peniskarzinoms relevanter Mechanismus zu sein scheint. Das Vorhandensein weiterer Mechanismen, welche zu einer verstärkten Aktivität des *PRC2*-Komplexes innerhalb dieser Tumorentität führen, ist aber wahrscheinlich (Busso-Lopes et al., 2015).

Entsprechend der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Datenbankanalysen weisen neben der *PRC2*-Komponente *EZH2* auch Mitglieder der *E2F*-Familie als mögliche Regulatoren des microRNA-Tripletts eine Überexpression in metastasierten Peniskarzinomen auf. Die *E2F*-Familie setzt sich zusammen aus insgesamt acht Transkriptionsfaktoren, wobei hinsichtlich der Transkription von Zielgenen zwischen Aktivatoren (*E2F1*, *E2F2* und *E2F3a*) und Repressoren (*E2F3b*, *E2F4*, *E2F5*, *E2F6*, *E2F7* und *E2F8*) unterschieden wird. Im Rahmen des *Rb/E2F1*-Signalweges sind die *E2F*-Mitglieder essentiell an der Zellzykluskontrolle beteiligt, während eine Deregulation dieser Signaltransduktionskette bereits bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen beschrieben wurde (Udayakumar et al., 2010). So wurde beispielsweise bei HPV-induzierten Tumoren wie dem Zervixkarzinom und auch dem Peniskarzinom eine *Rb*-Inaktivierung durch das virale Onkogen *E7* beobachtet (Doorbar, 2006; Poetsch et al., 2011). Weiterführende Ergebnisse wurden kürzlich im Rahmen von Experimenten an HPV-positiven-Peniskarzinomzelllinien validiert. Demnach zeigte sich der Transkriptionsfaktor *E2F1* in Zelllinien primär metastasierter Primärtumore sowie assoziierter Lymphknotenmetastasen verglichen mit Zelllinien nicht metastasierter Primärtumore signifikant hochreguliert. Zudem wurden durch eine *E2F1*-Überexpression eine Zunahme des Lymphgefäßwachstums sowie der migratorischen Aktivität der Zellen induziert, während eine Unterexpression mit verminderter Invasivität und verstärkter Chemosensitivität einherging (Fenner et al., 2017).

Eine Beteiligung der *E2F*-Familie an der Entstehung und dem Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms ist damit unumstritten. Unter 4.3 wurde bereits erwähnt, dass *YWHAZ* zu den möglichen Zielstrukturen des microRNA-Tripletts zählt und indirekt die tumorsuppressive Funktion von *TGF-β* in eine pro-metastatische Funktion umwandelt (Xu et al., 2015). Eine Deregulation des *TGF-β* scheint damit essentiell am Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms beteiligt zu sein. *TGF-β* wiederum hat

einen Einfluss auf die Expression von Mitgliedern der *E2F*-Familie (Ertosun et al., 2016). Eine Induktion der Transkriptionsfaktoren *E2F7* und *E2F8*, die angelehnt an die Transkriptom-Datenbankanalyse als mögliche Repressoren von *miR-101* identifiziert wurden, könnte damit *TGF- β* -vermittelt sein (Abb. 13).

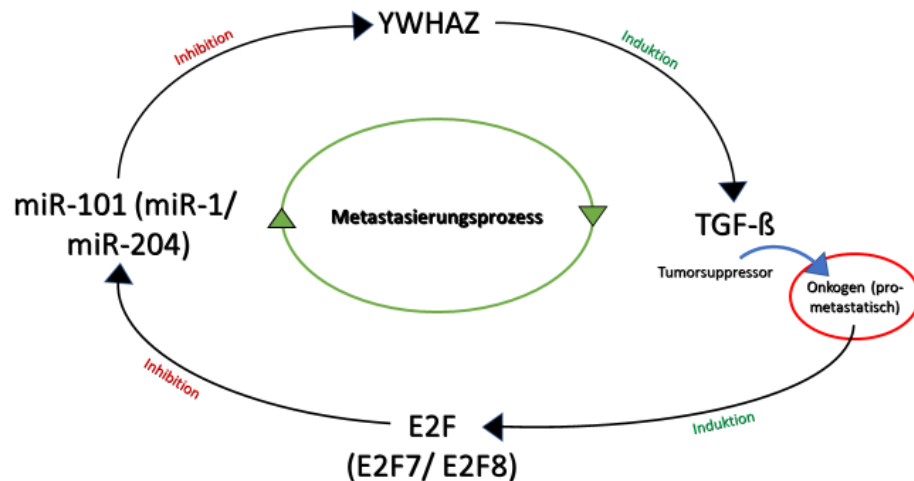


Abb. 13: Potentieller Feedbackmechanismus, welcher den Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms unterhält. *YWHAZ* gilt als mögliches Zielgen des microRNA-Tripletts und ist assoziiert mit Lymphgefäßinvasion, Zellmigration und Gefäßneubildung. Ein Expressionsverlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* führt damit zu einer erhöhten Expression von *YWHAZ*, welches wiederum die tumorsuppressive Funktion von *TGF- β* indirekt in eine pro-metastatische/onkogene Funktion umwandelt. *TGF- β* wiederum nimmt Einfluss auf die Expression von Mitgliedern der *E2F*-Familie. *E2F7* und *E2F8* konnten mithilfe einer Transkriptom-Datenbankanalyse als mögliche Repressoren von *miR-101* identifiziert werden. Damit entstünde ein den Metastasierungsprozess unterhaltender funktioneller Kreislauf, der u. a. gekennzeichnet ist durch einen simultanen Expressionsverlust des microRNA-Tripletts.

TGF- β wiederum wäre damit indirekt reguliert durch *YWHAZ* und somit auch durch das microRNA-Triplett selbst. Damit bestünde ein positiver Feedbackmechanismus, welcher den Metastasierungsprozess insgesamt unterhalten könnte. Ob und in welchem Zusammenhang die einzelnen Faktoren miteinander agieren gilt es jedoch in weiteren Experimenten zu untersuchen.

4.5 Bedeutung von Zelllinien bei der Erforschung des Peniskarzinoms unter Berücksichtigung des microRNA-Tripletts *miR-1*, *miR-101* und *miR-204*

Ebenso wie es nur wenige molekularbiologische Kenntnisse über den Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms und insbesondere auch microRNA-getriggerte Schlüsselereignisse für Kanzerogenese und Tumorprogression gibt, sind auch Versuche an Peniskarzinomzelllinien bisher sehr selten. Der Arbeitsgruppe um

Naumann gelang es im Jahr 2012 zwei Tumorzelllinien aus einem metastasierten Primärtumor und einer assoziierten Lymphknotenmetastase zu etablieren (Naumann et al., 2012). Durch heterotope Xenotransplantation der Zellen konnte ein zuverlässiges Tumorstadium *in vivo* nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren das Chemokin *CXCL14* und das membranständige Glykoprotein *Podoplanin* in Zelllinien aus Lymphknotenmetastasen signifikant unterexprimiert im Vergleich zu Zelllinien aus assoziierten Primärtumoren. Sowohl *CXCL14* als auch *Podoplanin* wurden bereits zuvor im Rahmen von Experimenten an anderen Tumorentitäten als pro-metastatische Faktoren beschrieben (Dumoff et al., 2006; Martin-Villar et al., 2005; Starnes et al., 2006). Im Jahr 2016 wurden von Chen et al. zwei weitere Zelllinien publiziert, die ebenfalls aus einem primär metastasierten Peniskarzinom und einer assoziierten Lymphknotenmetastase etabliert wurden. Diese Zelllinien eines HPV-negativen und mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinoms wiesen eine *Missense*-Genmutation des Tumorsuppressorproteins *p53* auf und zeigten sich chemosensibel gegenüber Cisplatin und Epirubicin. Die Kanzerogenität der aus der Lymphknotenmetastase stammenden Zelllinie wiederum konnte in immundefizienten Mäusen verifiziert werden (Chen et al., 2016).

Insgesamt bleibt die Repräsentativität der an den letztgenannten Zelllinien durchgeführten Analysen jedoch in Frage gestellt, da lediglich das Tumorgewebe eines einzelnen Patienten untersucht wurde. Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p53* als mögliches Schlüsselereignis für die Entstehung und Progression des Peniskarzinoms, auch aufgrund seiner Interaktion mit den HPV-assoziierten Onkogenen *E6* und *E7*, wurde zuvor bereits beschrieben. Insgesamt bleibt die Rolle von *p53* aufgrund insgesamt widersprüchlicher Ergebnisse jedoch unklar, was die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen unterstreicht (Martins et al., 2002; Poetsch et al., 2011; Protzel und Hakenberg, 2013). Dennoch können die erzielten Ergebnisse zur Etablierung weiterer Peniskarzinomzelllinien sowie zur Überprüfung der Chemosensitivität für kommende Versuchsreihen genutzt werden. Besonders im Hinblick auf die angestrebte Verbesserung der Therapien bei bestehenden Resistenzen des Peniskarzinoms durch präziser wirkende Chemotherapieregime und einer damit einhergehenden Verbesserung der allgemeinen Prognose verspricht die Verfügbarkeit weiterer Zelllinien des Peniskarzinoms langfristig direkten Nutzen für betroffene Männer.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuche an den von unseren Kooperationspartnern (PD Dr. med. Carsten Maik Naumann/Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff, Klinik für Urologie und Kinderurologie des UKSH Campus Kiel) zur Verfügung

gestellten Zelllinien beschränkten sich zunächst auf die Überprüfung ihrer Eignung für weitere Analysen auf microRNA-Ebene und damit auf die Repräsentativität für die Aggressivität des Peniskarzinoms. Die mithilfe des *Boyden-Chamber-Assays* gewonnenen Ergebnisse zeigen eine signifikant vermehrte Invasivität der Zelllinien inguinaler Lymphknotenmetastasen (Kilk-k, Kilk-d) im Vergleich zu Primärtumorzelllinien des Peniskarzinoms (PeCa, PeCa-D). Darüber hinaus ergab sich eine relevante Unterexpression von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* in Zelllinien metastasierter Primärtumore sowie assoziierter und nicht-assoziiierter Lymphknotenmetastasen gegenüber einer Zelllinie aus gesundem plattenepitheliale Gewebe (VH6).

Die beschriebene vermehrte Invasivität der Zellen inguinaler Lymphknotenmetastasen sowie die Reproduzierbarkeit der zuvor anhand einer größeren Anzahl von Proben gewonnenen Ergebnisse zu möglicherweise metastasierungsrelevanten microRNAs lassen alle vier Zelllinien als geeignet für weitere Versuchsreihen auf microRNA-Ebene erscheinen. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass Zelllinien aus frühen, nicht metastasierten Primärtumoren bisher nicht etabliert und untersucht wurden. Weitere Ergebnisse sind daher abzuwarten.

5 Zusammenfassung

Mit einer Inzidenz von nur einer Neuerkrankung pro 100.000 Einwohner pro Jahr ist das Peniskarzinom in westlichen Nationen eine seltene Erkrankung. Die für die Tumorforschung zur Verfügung stehende Patientenzahl ist daher sehr limitiert. Somit sind die Kenntnisse über molekularpathologische Prozesse, die Tumorentwicklung und Progression beeinflussen und zu einer häufig frühen lymphogenen Metastasierung führen, bisher gering. Hieraus resultieren oft unzureichende Therapiestrategien mit nur geringer Evidenz.

Die Bedeutung von microRNAs im Rahmen von Tumorgenese und Metastasierung ist im Laufe der letzten Jahre zunehmend deutlich geworden. Da ein positiver Lymphknotenstatus der bis dato wichtigste Marker für die Prognose des Peniskarzinoms darstellt, war es das Ziel dieser Arbeit, microRNAs zu identifizieren, die eine klinische Unterscheidung zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren erlauben. Diese sollten dann auf ihre prognostische Wertigkeit überprüft werden.

Mithilfe von microRNA Arrays konnten zunächst mehrere potentiell metastasierungsrelevante microRNAs identifiziert werden. Dies wurde in Tumorgewebe einer größeren Patientenzahl validiert mit dem Ergebnis, dass ein microRNA-Triplett, bestehend aus *miR-1*, *miR-101* und *miR-204*, als charakteristisch für das metastasierende Peniskarzinom definiert werden konnte. Der Expressionsverlust dieser microRNAs könnte damit ein Schlüsselereignis beim Metastasierungsprozess dieses Tumortyps darstellen. Anschließend durchgeführte Datenbankanalysen weisen auf einen Zusammenhang zwischen den miR-Expressionslevels und dem Methylierungsstatus über die Regulation des *PRC2*-Komplexes hin.

Mithilfe einer Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier konnte schließlich nachgewiesen werden, dass der gemeinsame Expressionsverlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* in direktem Zusammenhang mit der Prognose von Patienten steht. Diese microRNA-Signatur könnte damit als Surrogatparameter für Hochrisikopatienten gelten und als Entscheidungshilfe über die Anwendung aggressiver oder weniger aggressiver Therapiekonzepte herangezogen werden.

Darüber hinaus scheint das gefundene microRNA-Triplett in der Deregulation des *TGF- β* -Signalweges involviert zu sein, welche ebenfalls ein mögliches Schlüsselereignis bei der nodalen Ausbreitung des Peniskarzinoms darstellen könnte. Die Möglichkeiten einer therapeutischen Inhibition des *TGF- β* -Signalweges bei bereits lymphogen metastasierten Karzinomen wurden bisher nicht untersucht, stellen aber einen

vielversprechenden Ansatz für weitere Versuche und damit die Aussicht auf wirkungsvollere Therapieoptionen dar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben damit erstmalig eine für das Peniskarzinom charakteristische microRNA-Signatur, die als biologischer Marker für das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und gleichzeitig als Prädiktor für das krankheitsspezifische Überleben herangezogen werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Abou-Elhamd, K. E., Habib, T. N., Moussa, A. E. und Badawy, B. S., 2008.** The role of genetic susceptibility in head and neck squamous cell carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* 265, 217-222.
- Adams, B. D., Kasinski, A. L. und Slack, F. J., 2014.** Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Current biology : CB* 24, R762-776.
- Ah-See, K. W., Cooke, T. G., Pickford, I. R., Soutar, D. und Balmain, A., 1994.** An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 54, 1617-1621.
- Al Ghazal, A., Steffens, S., Steinestel, J., Lehmann, R., Schnoeller, T. J., Schulte-Hostede, A., Wegener, G., Jentzmik, F., Schrader, M., Kuczyk, M. A. und Schrader, A. J., 2013.** Elevated C-reactive protein values predict nodal metastasis in patients with penile cancer. *BMC urology* 13, 53.
- Alajez, N. M., Shi, W., Hui, A. B., Bruce, J., Lenarduzzi, M., Ito, E., Yue, S., O'Sullivan, B. und Liu, F. F., 2010.** Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) is overexpressed in recurrent nasopharyngeal carcinoma and is regulated by miR-26a, miR-101, and miR-98. *Cell death & disease* 1, e85.
- Alnajjar, H. M., Lam, W., Bolgeri, M., Rees, R. W., Perry, M. J. und Watkin, N. A., 2012.** Treatment of carcinoma in situ of the glans penis with topical chemotherapy agents. *European urology* 62, 923-928.
- Babashah, S. und Soleimani, M., 2011.** The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *European journal of cancer* 47, 1127-1137.
- Backes, D. M., Kurman, R. J., Pimenta, J. M. und Smith, J. S., 2009.** Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer causes & control : CCC* 20, 449-457.
- Ball, M. W., Bezerra, S. M., Chaux, A., Faraj, S. F., Gonzalez-Roibon, N., Munari, E., Sharma, R., Bivalacqua, T. J., Netto, G. J. und Burnett, A. L., 2016.** Overexpression of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Is Associated With Penile Cancer Progression. *Urology* 92, 51-56.
- Banerjee, R., Mani, R. S., Russo, N., Scanlon, C. S., Tsodikov, A., Jing, X., Cao, Q., Palanisamy, N., Metwally, T., Inglehart, R. C., Tomlins, S., Bradford, C., Carey, T., Wolf, G., Kalyana-Sundaram, S., Chinnaiyan, A. M., Varambally, S. und D'Silva, N. J., 2011.** The tumor suppressor gene rap1GAP is silenced by miR-101-mediated EZH2 overexpression in invasive squamous cell carcinoma. *Oncogene* 30, 4339-4349.

- Bartel, D. P., 2009.** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Barzon, L., Cappellesso, R., Peta, E., Militello, V., Sinigaglia, A., Fassan, M., Simonato, F., Guzzardo, V., Ventura, L., Blandamura, S., Gardiman, M., Palu, G. und Fassina, A., 2014.** Profiling of expression of human papillomavirus-related cancer miRNAs in penile squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 184, 3376-3383.
- Baserga, R., 2005.** The insulin-like growth factor-I receptor as a target for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 9, 753-768.
- Bauer, V. L., Braselmann, H., Henke, M., Mattern, D., Walch, A., Unger, K., Baudis, M., Lassmann, S., Huber, R., Wienberg, J., Werner, M. und Zitzelsberger, H. F., 2008.** Chromosomal changes characterize head and neck cancer with poor prognosis. *Journal of molecular medicine* 86, 1353-1365.
- Berindan-Neagoe, I., Monroig Pdel, C., Pasculli, B. und Calin, G. A., 2014.** MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA: a cancer journal for clinicians* 64, 311-336.
- Bevan-Thomas, R., Slaton, J. W. und Pettaway, C. A., 2002.** Contemporary morbidity from lymphadenectomy for penile squamous cell carcinoma: the M.D. Anderson Cancer Center Experience. *The Journal of urology* 167, 1638-1642.
- Bhagat, S. K., Gopalakrishnan, G., Kekre, N. S., Chacko, N. K., Kumar, S., Manipadam, M. T. und Samuel, P., 2010.** Factors predicting inguinal node metastasis in squamous cell cancer of penis. *World journal of urology* 28, 93-98.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. und Gorlich, D., 2004.** Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 10, 185-191.
- Busso-Lopes, A. F., Marchi, F. A., Kuasne, H., Scapulatempo-Neto, C., Trindade-Filho, J. C., de Jesus, C. M., Lopes, A., Guimaraes, G. C. und Rogatto, S. R., 2015.** Genomic profiling of human penile carcinoma predicts worse prognosis and survival. *Cancer prevention research* 8, 149-156.
- Calin, G. A. und Croce, C. M., 2006.** MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer* 6, 857-866.
- Callegari, E., Elamin, B. K., Giannone, F., Milazzo, M., Altavilla, G., Fornari, F., Giacomelli, L., D'Abundo, L., Ferracin, M., Bassi, C., Zagatti, B., Corra, F., Miotto, E., Lupini, L., Bolondi, L., Gramantieri, L., Croce, C. M., Sabbioni, S. und Negrini, M., 2012.** Liver tumorigenicity promoted by microRNA-221 in a mouse transgenic model. *Hepatology* 56, 1025-1033.

- Cao, Q., Yu, J., Dhanasekaran, S. M., Kim, J. H., Mani, R. S., Tomlins, S. A., Mehra, R., Laxman, B., Cao, X., Yu, J., Kleer, C. G., Varambally, S. und Chinnaiyan, A. M., 2008.** Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* 27, 7274-7284.
- Chang, J. W., Gwak, S. Y., Shim, G. A., Liu, L., Lim, Y. C., Kim, J. M., Jung, M. G. und Koo, B. S., 2016.** EZH2 is associated with poor prognosis in head-and-neck squamous cell carcinoma via regulating the epithelial-to-mesenchymal transition and chemosensitivity. *Oral oncology* 52, 66-74.
- Chen, J., Yao, K., Li, Z., Deng, C., Wang, L., Yu, X., Liang, P., Xie, Q., Chen, P., Qin, Z., Ye, Y., Liu, Z., Zhou, F., Zhang, Z. und Han, H., 2016.** Establishment and characterization of a penile cancer cell line, pen11, with a deleterious TP53 mutation as a paradigm of HPV-negative penile carcinogenesis. *Oncotarget* 7, 51687-51698.
- Chi, P., Allis, C. D. und Wang, G. G., 2010.** Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nature reviews. Cancer* 10, 457-469.
- Daling, J. R., Madeleine, M. M., Johnson, L. G., Schwartz, S. M., Shera, K. A., Wurscher, M. A., Carter, J. J., Porter, P. L., Galloway, D. A., McDougall, J. K. und Krieger, J. N., 2005.** Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 116, 606-616.
- Davis, B. N. und Hata, A., 2009.** Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell communication and signaling : CCS* 7, 18.
- De Hoon, M. J. L., Imoto, S., Nolan, J. und Miyano, S., 2004.** Open Source Clustering Software *Bioinformatics* 20, 1453-1454.
- De Sarkar, N., Roy, R., Mitra, J. K., Ghose, S., Chakraborty, A., Paul, R. R., Mukhopadhyay, I. und Roy, B., 2014.** A quest for miRNA bio-marker: a track back approach from gingivo buccal cancer to two different types of precancers. *PloS one* 9, e104839.
- DeBerardinis, R. J. und Chandel, N. S., 2016.** Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances* 2, e1600200.
- DeFilippis, R. A., Goodwin, E. C., Wu, L. und DiMaio, D., 2003.** Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Journal of virology* 77, 1551-1563.
- Doorbar, J., 2006.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science* 110, 525-541.

- Dumoff, K. L., Chu, C. S., Harris, E. E., Holtz, D., Xu, X., Zhang, P. J. und Acs, G., 2006.** Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19, 708-716.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. und Harlow, E., 1989.** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.
- Ertosun, M. G., Hapil, F. Z. und Osman Nidai, O., 2016.** E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 31, 17-25.
- Feber, A., Arya, M., de Winter, P., Saqib, M., Nigam, R., Malone, P. R., Tan, W. S., Rodney, S., Lechner, M., Freeman, A., Jameson, C., Muneer, A., Beck, S. und Kelly, J. D., 2015.** Epigenetics markers of metastasis and HPV-induced tumorigenesis in penile cancer. *Clin Cancer Res* 21, 1196-1206.
- Fenner, F., Goody, D., Protzel, C., Erbersdobler, A., Richter, C., Hartz, J. M., Naumann, C. M., Kalthoff, H., Herchenroder, O., Hakenberg, O. W. und Putzer, B. M., 2017.** E2F1 Signalling is Predictive of Chemoresistance and Lymphogenic Metastasis in Penile Cancer: A Pilot Functional Study Reveals New Prognostic Biomarkers. *European urology focus*.
- Ferrandiz-Pulido, C., Masferrer, E., Toll, A., Hernandez-Losa, J., Mojal, S., Pujol, R. M., Ramon y Cajal, S., de Torres, I. und Garcia-Patos, V., 2013.** mTOR signaling pathway in penile squamous cell carcinoma: pmTOR and pelf4E over expression correlate with aggressive tumor behavior. *The Journal of urology* 190, 2288-2295.
- Fischer, S., Handrick, R., Aschrafi, A. und Otte, K., 2015.** Unveiling the principle of microRNA-mediated redundancy in cellular pathway regulation. *RNA biology* 12, 238-247.
- Gits, C. M., van Kuijk, P. F., Jonkers, M. B., Boersma, A. W., van Ijcken, W. F., Wozniak, A., Scot, R., Rutkowski, P., Schoffski, P., Taguchi, T., Mathijssen, R. H., Verweij, J., Sleijfer, S., Debiec-Rychter, M. und Wiemer, E. A., 2013.** MiR-17-92 and miR-221/222 cluster members target KIT and ETV1 in human gastrointestinal stromal tumours. *British journal of cancer* 109, 1625-1635.
- Graafland, N. M., Lam, W., Leijte, J. A., Yap, T., Gallee, M. P., Corbishley, C., van Werkhoven, E., Watkin, N. und Horenblas, S., 2010.** Prognostic factors for occult inguinal lymph node involvement in penile carcinoma and assessment of the high-risk EAU subgroup: a two-institution analysis of 342 clinically node-negative patients. *European urology* 58, 742-747.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. und Shiekhattar, R., 2005.** Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.

- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. und Shiekhattar, R., 2004.** The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.
- Hakenberg, O. W., Comperat, E. M., Minhas, S., Necchi, A., Protzel, C., Watkin, N. und European Association of, U., 2015.** EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. *European urology* 67, 142-150.
- Hakenberg, O. W., Nippgen, J. B., Froehner, M., Zastrow, S. und Wirth, M. P., 2006.** Cisplatin, methotrexate and bleomycin for treating advanced penile carcinoma. *BJU international* 98, 1225-1227.
- Hakenberg, O. W. und Protzel, C., 2014.** Organ-preserving therapy for penile carcinoma. *Der Urologe. Ausg. A* 53, 1316-1321.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A., 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hartz, J. M., Engelmann, D., Furst, K., Marquardt, S., Spitschak, A., Goody, D., Protzel, C., Hakenberg, O. W. und Putzer, B. M., 2016.** Integrated loss of miR-1/-101/-204 discriminates metastatic from non-metastatic penile carcinomas and can predict patient outcome. *The Journal of urology*.
- Hegarty, P. K., Shabbir, M., Hughes, B., Minhas, S., Perry, M., Watkin, N. und Ralph, D. J., 2009.** Penile preserving surgery and surgical strategies to maximize penile form and function in penile cancer: recommendations from the United Kingdom experience. *World journal of urology* 27, 179-187.
- Holzinger, D., Schmitt, M., Dyckhoff, G., Benner, A., Pawlita, M. und Bosch, F. X., 2012.** Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer Res* 72, 4993-5003.
- Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J. A., Herrmann, A. L. und Hoppe-Seyler, F., 2017.** The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in microbiology*.
- Horenblas, S., von Krogh, G., Cubilla, A. L., Dillner, J., Meijer, C. J. und Hedlund, P. O., 2000.** Squamous cell carcinoma of the penis: premalignant lesions. *Scandinavian journal of urology and nephrology. Supplementum*, 187-188.
- Hutvagner, G. und Zamore, P. D., 2002.** A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.
- Knoll, S., Emmrich, S. und Putzer, B. M., 2013.** The E2F1-miRNA cancer progression network. *Advances in experimental medicine and biology* 774, 135-147.

- Konno, Y., Dong, P., Xiong, Y., Suzuki, F., Lu, J., Cai, M., Watari, H., Mitamura, T., Hosaka, M., Hanley, S. J., Kudo, M. und Sakuragi, N., 2014.** MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells. *Oncotarget* 5, 6049-6062.
- Kuasne, H., Colus, I. M., Busso, A. F., Hernandez-Vargas, H., Barros-Filho, M. C., Marchi, F. A., Scapulatempo-Neto, C., Faria, E. F., Lopes, A., Guimaraes, G. C., Herceg, Z. und Rogatto, S. R., 2015.** Genome-wide methylation and transcriptome analysis in penile carcinoma: uncovering new molecular markers. *Clinical epigenetics* 7, 46.
- Kuasne, H., Marchi, F. A., Rogatto, S. R. und de Syllos Colus, I. M., 2013.** Epigenetic mechanisms in penile carcinoma. *International journal of molecular sciences* 14, 10791-10808.
- Kulis, M. und Esteller, M., 2010.** DNA methylation and cancer. *Advances in genetics* 70, 27-56.
- Kundt, G. und Krentz, H., 2009.** Epidemiologie und Medizinische Biometrie, 4 Edition. Shaker Verlag, Aachen, 237 p.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. und Ambros, V., 1993.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S. und Kim, V. N., 2002.** MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* 21, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. und Kim, V. N., 2004.** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.
- Lee, Y., Yang, X., Huang, Y., Fan, H., Zhang, Q., Wu, Y., Li, J., Hasina, R., Cheng, C., Lingen, M. W., Gerstein, M. B., Weichselbaum, R. R., Xing, H. R. und Lussier, Y. A., 2010.** Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumor metastasis. *PLoS computational biology* 6, e1000730.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R. und Golub, T. R., 2005.** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Lu, J., Zhao, F. P., Peng, Z., Zhang, M. W., Lin, S. X., Liang, B. J., Zhang, B., Liu, X., Wang, L., Li, G., Tian, W. D., Peng, Y., He, M. L. und Li, X. P., 2014.** EZH2 promotes angiogenesis through inhibition of miR-1/Endothelin-1 axis in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 5, 11319-11332.

- Ma, L., 2016.** MicroRNA and Metastasis. *Advances in cancer research* 132, 165-207.
- Maiche, A. G., Pyrhönen, S. und Karkinen, M., 1991.** Histological grading of squamous cell carcinoma of the penis: a new scoring system. *British Journal of urology* 67, 522-526.
- Martin-Villar, E., Scholl, F. G., Gamallo, C., Yurrita, M. M., Munoz-Guerra, M., Cruces, J. und Quintanilla, M., 2005.** Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 113, 899-910.
- Martins, A. C., Faria, S. M., Cologna, A. J., Suaid, H. J. und Tucci, S., Jr., 2002.** Immunoeexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. *The Journal of urology* 167, 89-92; discussion 92-83.
- Massague, J., 2008.** TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.
- Mavrakis, K. J., Van Der Meulen, J., Wolfe, A. L., Liu, X., Mets, E., Taghon, T., Khan, A. A., Setty, M., Rondou, P., Vandenberghe, P., Delabesse, E., Benoit, Y., Socci, N. B., Leslie, C. S., Van Vlierberghe, P., Speleman, F. und Wendel, H. G., 2011.** A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nature genetics* 43, 673-678.
- Minardi, D., d'Anzeo, G., Lucarini, G., Filosa, A., Zizzi, A., Simonetti, O., Polito, M., Jr., Offidani, A. M., Di Primio, R., Montironi, R. und Muzzonigro, G., 2011.** D2-40 immunoreactivity in penile squamous cell carcinoma: a marker of aggressiveness. *Hum Pathol* 42, 1596-1602.
- Miralles-Guri, C., Bruni, L., Cubilla, A. L., Castellsague, X., Bosch, F. X. und de Sanjose, S., 2009.** Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol* 62, 870-878.
- Munoz, J. J., Drigo, S. A., Barros-Filho, M. C., Marchi, F. A., Scapulatempo-Neto, C., Pessoa, G. S., Guimaraes, G. C., Trindade Filho, J. C., Lopes, A., Arruda, M. A. und Rogatto, S. R., 2015.** Down-Regulation of SLC8A1 as a Putative Apoptosis Evasion Mechanism by Modulation of Calcium Levels in Penile Carcinoma. *The Journal of urology* 194, 245-251.
- Mussunoor, S. und Murray, G. I., 2008.** The role of annexins in tumour development and progression. *The Journal of pathology* 216, 131-140.
- Naumann, C. M., Sperveslage, J., Hamann, M. F., Leuschner, I., Weder, L., Al-Najar, A. A., Lemke, J., Sipos, B., Junemann, K. P. und Kalthoff, H., 2012.** Establishment and characterization of primary cell lines of squamous cell carcinoma of the penis and its metastasis. *The Journal of urology* 187, 2236-2242.

- Nohata, N., Hanazawa, T., Kikkawa, N., Sakurai, D., Fujimura, L., Chiyomaru, T., Kawakami, K., Yoshino, H., Enokida, H., Nakagawa, M., Katayama, A., Harabuchi, Y., Okamoto, Y. und Seki, N., 2011a.** Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 105, 833-841.
- Nohata, N., Sone, Y., Hanazawa, T., Fuse, M., Kikkawa, N., Yoshino, H., Chiyomaru, T., Kawakami, K., Enokida, H., Nakagawa, M., Shozu, M., Okamoto, Y. und Seki, N., 2011b.** miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2, 29-42.
- Pang, M. F., Georgoudaki, A. M., Lambut, L., Johansson, J., Tabor, V., Hagikura, K., Jin, Y., Jansson, M., Alexander, J. S., Nelson, C. M., Jakobsson, L., Betsholtz, C., Sund, M., Karlsson, M. C. und Fuxe, J., 2016.** TGF-beta1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene* 35, 748-760.
- Parkin, D. M., Whelan, S. L., Ferlay, J., Teppo, L. und Thomas, D. P., 2002.** Cancer incidence in five continents. Volume VIII. IARC Sci Publ, 1-781.
- Pizzocaro, G., Algaba, F., Horenblas, S., Solsona, E., Tana, S., Van Der Poel, H., Watkin, N. A. und European Association of Urology Guidelines Group on Penile, C., 2010.** EAU penile cancer guidelines 2009. *European urology* 57, 1002-1012.
- Pizzocaro, G., Piva, L., Bandieramonte, G. und Tana, S., 1997.** Up-to-date management of carcinoma of the penis. *European urology* 32, 5-15.
- Poetsch, M., Hemmerich, M., Kakies, C., Kleist, B., Wolf, E., vom Dorp, F., Hakenberg, O. W. und Protzel, C., 2011.** Alterations in the tumor suppressor gene p16(INK4A) are associated with aggressive behavior of penile carcinomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 458, 221-229.
- Poetsch, M., Schuart, B. J., Schwesinger, G., Kleist, B. und Protzel, C., 2007.** Screening of microsatellite markers in penile cancer reveals differences between metastatic and nonmetastatic carcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20, 1069-1077.
- Populo, H., Lopes, J. M. und Soares, P., 2012.** The mTOR signalling pathway in human cancer. *International journal of molecular sciences* 13, 1886-1918.
- Protzel, C., Alcaraz, A., Horenblas, S., Pizzocaro, G., Zlotta, A. und Hakenberg, O. W., 2009.** Lymphadenectomy in the surgical management of penile cancer. *European urology* 55, 1075-1088.
- Protzel, C. und Hakenberg, O. W., 2009.** Chemotherapy in patients with penile carcinoma. *Urologia internationalis* 82, 1-7.

- Protzel, C. und Hakenberg, O. W., 2013.** [Penile carcinoma: diagnosis and therapy]. Der Urologe. Ausg. A 52, 87-98.
- Protzel, C., Kakies, C., Kleist, B., Poetsch, M. und Giebel, J., 2008.** Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. Virchows Archiv : an international journal of pathology 452, 369-375.
- Protzel, C., Knoedel, J., Zimmermann, U., Woenckhaus, C., Poetsch, M. und Giebel, J., 2007.** Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas. Histology and histopathology 22, 1197-1204.
- Protzel, C., Richter, M., Poetsch, M., Kakies, C., Zimmermann, U., Woenckhaus, C., Klebingat, K. J., Hakenberg, O. W. und Giebel, J., 2011.** The role of annexins I, II and IV in tumor development, progression and metastasis of human penile squamous cell carcinomas. World journal of urology 29, 393-398.
- Protzel, C., Seitz, A. K., Hakenberg, O. W. und Retz, M., 2013.** Neoadjuvant, adjuvant and palliative chemotherapy of penile cancer. Der Urologe. Ausg. A 52, 1556-1560, 1562-1553.
- Prue, G., Lawler, M., Baker, P. und Warnakulasuriya, S., 2016.** Human Papillomavirus (HPV): Making the case for "Immunisation for All". Oral diseases.
- Qin, J. und Luo, M., 2014.** MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK. FEBS letters 588, 99-104.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., 1989.** Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. und Howley, P. M., 1993.** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell 75, 495-505.
- Seitz, A. K., Protzel, C., Retz, M. und Arbeitsgemeinschaft Urologische Onkologie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V., 2014.** Current state of chemotherapy in treatment of advanced penile cancer. Aktuelle Urologie 45, 286-292.
- Siegel, R., Naishadham, D. und Jemal, A., 2012.** Cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians 62, 10-29.
- Sobin, L. H. G., M.; Wittekind, C., 2009.** TNM Classification of Malignant Tumors, 7 Edition. Wiley-Blackwell, New York.

- Sonpavde, G., Pagliaro, L. C., Buonerba, C., Dorff, T. B., Lee, R. J. und Di Lorenzo, G., 2013.** Penile cancer: current therapy and future directions. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 24, 1179-1189.
- Starnes, T., Rasila, K. K., Robertson, M. J., Brahmi, Z., Dahl, R., Christopherson, K. und Hromas, R., 2006.** The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Experimental hematology* 34, 1101-1105.
- Stuiver, M. M., Djajadiningrat, R. S., Graafland, N. M., Vincent, A. D., Lucas, C. und Horenblas, S., 2013.** Early wound complications after inguinal lymphadenectomy in penile cancer: a historical cohort study and risk-factor analysis. *European urology* 64, 486-492.
- Thoma, C., 2016.** Penile cancer: Ongoing search for molecular prognostic markers. *Nature reviews. Urology* 13, 184.
- Udayakumar, T., Shareef, M. M., Diaz, D. A., Ahmed, M. M. und Pollack, A., 2010.** The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy. *Seminars in radiation oncology* 20, 258-266.
- Varambally, S., Cao, Q., Mani, R. S., Shankar, S., Wang, X., Ateeq, B., Laxman, B., Cao, X., Jing, X., Ramnarayanan, K., Brenner, J. C., Yu, J., Kim, J. H., Han, B., Tan, P., Kumar-Sinha, C., Lonigro, R. J., Palanisamy, N., Maher, C. A. und Chinnaiyan, A. M., 2008.** Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322, 1695-1699.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Rubin, M. A. und Chinnaiyan, A. M., 2002.** The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C. und Croce, C. M., 2006.** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2257-2261.
- Wang, F., Song, G., Liu, M., Li, X. und Tang, H., 2011.** miRNA-1 targets fibronectin1 and suppresses the migration and invasion of the HEP2 laryngeal squamous carcinoma cell line. *FEBS letters* 585, 3263-3269.
- Wang, L., Zhang, X., Jia, L. T., Hu, S. J., Zhao, J., Yang, J. D., Wen, W. H., Wang, Z., Wang, T., Zhao, J., Wang, R. A., Meng, Y. L., Nie, Y. Z., Dou, K. F., Chen, S. Y., Yao, L. B., Fan, D. M., Zhang, R. und Yang, A. G., 2014.** c-Myc-mediated epigenetic silencing of MicroRNA-101 contributes to dysregulation of multiple pathways in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 59, 1850-1863.

- Wang, R., van Leeuwen, R. W., Boers, A., Klip, H. G., de Meyer, T., Steenbergen, R. D., van Criekinge, W., van der Zee, A. G., Schuurin, E. und Wisman, G. B., 2016.** Genome-wide methylome analysis using MethylCap-seq uncovers 4 hypermethylated markers with high sensitivity for both adeno- and squamous-cell cervical carcinoma. *Oncotarget* 7, 80735-80750.
- Wicki, A. und Christofori, G., 2007.** The potential role of podoplanin in tumour invasion. *British journal of cancer* 96, 1-5.
- Xu, J., Acharya, S., Sahin, O., Zhang, Q., Saito, Y., Yao, J., Wang, H., Li, P., Zhang, L., Lowery, F. J., Kuo, W. L., Xiao, Y., Ensor, J., Sahin, A. A., Zhang, X. H., Hung, M. C., Zhang, J. D. und Yu, D., 2015.** 14-3-3zeta turns TGF-beta's function from tumor suppressor to metastasis promoter in breast cancer by contextual changes of Smad partners from p53 to Gli2. *Cancer cell* 27, 177-192.
- Xu, L., Beckebaum, S., Iacob, S., Wu, G., Kaiser, G. M., Radtke, A., Liu, C., Kabar, I., Schmidt, H. H., Zhang, X., Lu, M. und Cicinnati, V. R., 2014.** MicroRNA-101 inhibits human hepatocellular carcinoma progression through EZH2 downregulation and increased cytostatic drug sensitivity. *Journal of hepatology* 60, 590-598.
- Zhang, Z., Mitra, R. S., Henson, B. S., Datta, N. S., McCauley, L. K., Kumar, P., Lee, J. S., Carey, T. E. und D'Silva, N. J., 2006.** Rap1GAP inhibits tumor growth in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 168, 585-596.
- Zheng, H., Gao, L., Feng, Y., Yuan, L., Zhao, H. und Cornelius, L. A., 2009.** Down-regulation of Rap1GAP via promoter hypermethylation promotes melanoma cell proliferation, survival, and migration. *Cancer Res* 69, 449-457.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:

- Hartz, J. M., Engelmann, D., Fürst, K., Marquardt, S., Spitschak, A., Goody, D., Protzel, C., Hakenberg, O. W., Pützer, B. M., 2016.** Integrated Loss of miR-1/miR-101/miR-204 Discriminates Metastatic from Nonmetastatic Penile Carcinomas and Can Predict Patient Outcome. *J Urol.* 2016 Aug;196(2):570-8. doi: 10.1016/j.juro.2016.01.115.
- Fenner, F., Goody, D., Protzel, C., Erbersdobler, A., Richter, C., Hartz, J. M., Naumann, C. M., Kalthoff, H., Herchenröder, O., Hakenberg, O. W., Pützer, B. M., 2017.** E2F1 Signalling is Predictive of Chemoresistance and Lymphogenic Metastasis in Penile Cancer: A Pilot Functional Study Reveals New Prognostic Biomarkers. *Eur Urol Focus.* 2017 Mar 1. pii: S2405-4569(17)30056-1. doi: 10.1016/j.euf.2017.02.009.

7 Thesen

These 1

In westlichen Industrienationen ist das Peniskarzinom eine seltene Erkrankung. Das Interesse an der umfassenden Erforschung seiner molekularbiologischen Vorgänge, welche an Kanzerogenese und Metastasierung beteiligt sind, ist zwar groß, die Anzahl zur Verfügung stehender Proben wiederum jedoch deutlich limitiert.

These 2

Mit Ausnahme weniger histologischer Subtypen ist das Plattenepithelkarzinom des Penis ein fast ausschließlich lymphogen metastasierender Tumor.

These 3

Der Befall inguinaler Lymphknoten stellt bisher den wichtigsten prognostischen Faktor dar, während seine Detektion trotz moderner diagnostischer Möglichkeiten weiterhin schwierig ist.

These 4

Ein invasives Lymphknoten-Staging wird ab dem Tumorstadium pT1 G1 vorgenommen, womit bis zu 80% der Betroffenen übertherapiert werden und damit zum Teil an den schwerwiegenden Folgen einer inguinalen Lymphadenektomie leiden.

These 5

Über die Degradation sowie Translationshemmung von mRNAs greifen microRNAs in eine Vielzahl von Signalwegen ein, welche für Tumorgenese und -progression und damit auch für den Metastasierungsprozess von großer Bedeutung sind.

These 6

Ziel dieser Arbeit war es, für das Peniskarzinom metastasierungsrelevante microRNAs zu identifizieren.

These 7

Der integrierte Verlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* vermag *in vitro* metastasierte von nicht metastasierten Primärtumoren zu unterscheiden.

These 8

Der simultane Expressionsverlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* könnte ein möglicher Initiator für die nodale Aussaat wie auch ein möglicher Indikator für den erfolgten Metastasierungsprozess des Peniskarzinoms sein.

These 9

Der integrierte Verlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose gegenüber der kombinierten Überexpression dieses microRNA-Tripletts.

These 10

Zwischen den Expressionslevels der microRNAs *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* zeigt sich eine signifikante positive Korrelation, was einen funktionellen Zusammenhang zwischen ihnen vermuten lässt.

These 11

Der kombinierte Expressionsverlust von *miR-1*, *miR-101* und *miR-204* und die damit einhergehende Dysregulation des *TGF- β* -Signalweges könnte ein Schlüsselereignis für die nodale Metastasierung des Peniskarzinoms darstellen.

These 12

Die Promotor-Hypermethylierung im Rahmen einer *EZH2*-Überexpression scheint ein für den integrierten Verlust des beschriebenen microRNA-Tripletts und damit für die Entstehung und Progression des Peniskarzinoms relevanter Mechanismus zu sein.

8 Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Pützer für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die fordernde und konstruktive Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils, wie auch bei der schriftlichen Verfassung meiner Arbeit danken. Die Möglichkeit, diese Arbeit durchführen zu können, war eine große Herausforderung und hat mich zugleich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich in vielen Bereichen weitergebracht.

Dank meines persönlichen Betreuers, Dr. David Engelmann, dessen fachliche Beratung sowie kritische Betrachtung meiner Ergebnisse mich unablässig begleitet haben, habe ich selbst bei Schwierigkeiten und Misserfolgen nie die Motivation verloren. Stets war er offen und bereit, mir bei Problemen und Fragestellungen zur Seite zu stehen.

Mein besonderer Dank gilt auch Alf Spitschak, der ständig, selbst an Wochenenden, um das Vorankommen meiner Arbeit bemüht war. Ohne seine uneigennützige Unterstützung bei fachlichen Problemen, wäre die Durchführung meiner Versuchsreihen im Labor und die Auswertung meiner Ergebnisse noch langwieriger und schwieriger verlaufen.

Zudem danke ich dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Herrn Prof. Erbersdobler für die Bereitstellung der verwendeten FFPE-Proben und die stets gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Katharina Fürst, Deborah Goody, Anja Stoll, Susanne Knoll, Ingrid Winkler, Dr. Sophie Joost und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IEGT für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bedanken. Ohne sie alle wäre die Umsetzung meiner experimentellen Arbeit neben meinem Medizinstudium an der Universität Rostock nicht möglich gewesen.

Zuletzt richtet sich mein Dank an meine Eltern, Edeltraud und Dr. Joachim Hartz. Insbesondere in der Zeit der schriftlichen Verfassung meiner Arbeit haben sie mir viel Kraft und Ruhe gegeben. Darüber hinaus geht mein Dank auch an meinen Bruder Jochen Henrik Hartz, sowie an meine Freunde Dr. Sophie Joost, Martin Scherdin, Katrin Wickmann, Stephanie Pritsch, Katharina Simon und Tom Gödicke, die mich immer wieder aufs Neue motiviert, zum Durchhalten und Weitermachen im positiven Sinne gezwungen und stets an mich geglaubt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname: Juliane Marie
 Nachname: Hartz
 Geburtsdatum und -ort: 13.06.1987, Hannover
 Familienstand: ledig, jüngere Tochter der Medienberaterin Edeltraud Hartz und des Zahnarztes Dr. Joachim Hartz

Werdegang:

SCHULAUFBILDUNG

08/1999 – 06/2006	Gymnasium Walsrode, Abschluss mit dem Abitur
-------------------	--

STUDIUM

10/2007 – 07/2008	Studium der Physik und Anglistik an der Universität Göttingen (2 Semester)
10/2008 – 09/2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Göttingen (Vorklinik) Abschluss mit dem 1. Staatsexamen
10/2010 – 12/2014	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock (klinischer Abschnitt) Abschluss mit dem 2. Staatsexamen

FAMULATUREN

03/2011 – 04/2011	Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Göttingen (4 Wochen)
08/2011 – 09/2011	Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Rostock (4 Wochen)
03/2012 – 04/2012	Kardiologische Praxis am Saarplatz, Rostock (4 Wochen)
09/2012	Radiologische Praxis am Lindenpark, Rostock (2 Wochen)
04/2013	Praxis für Kinderheilkunde, Rostock (2 Wochen)

PRAKTISCHES JAHR

08/2013 – 12/2013	1. <i>Tertial/Chirurgie</i> : Abteilung für Kinderchirurgie an der Universität Rostock (2 Monate), Abteilung für Unfallchirurgie an der Universität Rostock (2 Monate)
12/2013 – 03/2014	2. <i>Tertial/Innere Medizin</i> : Abteilung für Innere Medizin am Queen Elizabeth Central Hospital, Blantyre, Malawi (4 Monate)
03/2014 – 06/2014	3. <i>Tertial/Wahlfach</i> : Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie an der Universität Rostock (4 Monate)

SONSTIGE FACHSPEZIFISCHE TÄTIGKEITEN

08/2008	Praktikum in der Abteilung für Orthopädie im Annastift Hannover (4 Wochen)
10/2011 – 09/2014	Nachtwache in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Rostock

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Seit 06/2015	Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock
--------------	---

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Darüber hinaus versichere ich, dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Rostock, den 29. Mai 2018

Juliane Marie Hartz